



**Untersuchung des Einflusses von Tellurit auf die
Wirksamkeit von Antibiotika bei uropathogenen
Pseudomonas aeruginosa-Isolaten**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

Dissertation

von Ann-Kathrin Meyer
aus Braunschweig

1. Referent: Privatdozent Dr.-Ing. Max Schobert
2. Referent: Professor Dr. Dieter Jahn
eingereicht am: 20.10.2014
mündliche Prüfung (Disputation) am: 15.12.2014

Druckjahr 2015

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaft, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Tielen, P.^{*}, Rosin, N.^{*}, Meyer, A-K.^{*}, Dohnt, K., Haddad, I., Jänsch, L., Klein, J., Narten, M., Pommerenke, C., Scheer, M., Schobert, M., Schomburg, D., Thielen, B. & Jahn, D. Regulatory and Metabolic Networks for the Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Urinary Tract-Like Conditions. Plos One 8: e71845 (2013).
(*equally contributed)

Tielen, P., Wibberg, D., Blom, J., Rosin, N., Meyer, A-K., Bunk, B., Schobert, M., Tüpker, R., Schatschneider, S., Rückert, C., Albersmeier, A., Goesmann, A., Vorhölter, F. J., Jahn, D. & Pühler, A. Genome Sequence of the Small-Colony Variant *Pseudomonas aeruginosa* MH27, Isolated from a Chronic Urethral Catheter Infection. Genome announcements 2: e01174-13 (2014).

Tagungsbeiträge:

Meyer, A-K., Michel, W., Tielen, P. & Jahn, D. Influence of tellurite on the effect of antibiotics on clinical urinary tract isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. (Poster) Fourteenth Conference on Pseudomonas, Lausanne, Switzerland (2013).

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Glossar.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Harnwegsinfektionen.....	1
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.3 Pathogenität von <i>P. aeruginosa</i>	5
1.4 Antibiotika.....	9
1.5 Antibiotikaresistenz von <i>P. aeruginosa</i>	11
1.6 Tellurit	14
1.7 Reaktive Sauerstoffspezies.....	16
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit.....	19
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Materialien.....	20
2.1.1 Geräte und Hilfsmittel	20
2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Antibiotika.....	22
2.1.3 Medien und Lösungen	24
2.2 Mikrobiologische Methoden	26
2.2.1 Sterilisation	26
2.2.2 Verwendete Bakterienstämme	26
2.2.3 Kultivierungsbedingungen.....	27
2.2.3.1 Anzucht von Übernachtskulturen	27
2.2.3.2 Kultivierung auf Festmedium	27
2.2.4 Gewinnung von Probenmaterial für die Transkriptomanalyse und ¹³ C- metabolische Flussanalyse in Anwesenheit von Tellurit und Ciprofloxacin.....	27
2.2.5 Langzeitlagerung von Bakterien	28
2.2.6 Bestimmung der Zelldichte.....	28
2.2.7 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KbE).....	29
2.2.8 MIC-Bestimmung auf tellurithaltigem Agarnährmedien	29

2.2.9 MIC-Bestimmung auf Agarnährmedien	31
2.3 Zellbiologische Methoden	31
2.3.1 Verwendete Zelllinie.....	31
2.3.2 Passagieren der Zellen	31
2.3.3 Kryokonservierung der Zellen	32
2.3.4 Reanimation der kryokonservierten Zellen.....	32
2.3.5 Bestimmung der Zellzahl.....	33
2.3.6 Aussäen von Zellen.....	33
2.4 Biochemische Methoden	33
2.4.1 MTT-Test.....	33
2.4.2 Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies	34
2.5 Molekularbiologische Methoden.....	36
2.5.1 Grundlagen für die Isolierung von RNA	36
2.5.2 Zellernte für die Isolierung von RNA.....	36
2.5.3 RNeasy Mini Kit von Qiagen	36
2.5.4 Quantifizierung und Qualitätskontrolle der isolierten RNA.....	37
2.5.5 Transkriptomanalyse.....	37
2.5.5.1 Präparation der Agilent Gene Expression Microarrays	38
2.5.5.2 Prozessierung der Agilent Gene Expression Microarrays	38
3 Ergebnisse und Diskussion	40
3.1 Sequenzierung und Annotierung uropathogenen <i>P. aeruginosa</i> -Isolate	40
3.2 Tellurit verstärkt die Wirkung von Antibiotika.....	49
3.3 Der Einfluss von Tellurit auf die Wirksamkeit von Antibiotika ist konzentrationsabhängig und synergistisch	60
3.4 Tellurit wirkt nicht zytotoxisch auf humane Epithelzellen in antimikrobiell wirksamen Konzentrationen.....	64
3.5 Tellurit erhöht die intrazelluläre Bildung von ROS	68
3.6 Untersuchung des Wirkmechanismus der Tellurit-vermittelten Steigerung der Antibiotikawirksamkeit	78
3.6.1 Charakterisierung der transkriptionellen Antwort von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit	79

3.6.2 Charakterisierung des zentralen Kohlenstoffwechsels von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit	89
4 Zusammenfassung	96
5 Ausblick	97
6 Abbildungsverzeichnis	98
7 Tabellenverzeichnis	100
8 Literaturverzeichnis	102
Anhang	131
Danksagung.....	153

Abkürzungen und Glossar

AUM	artifizielles Urinmedium
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAUTI	<i>catheter-associated urinary tract infection</i>
CDF	<i>cation diffusion facilitator</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CoASH	Coenzym A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDP	Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg
EMPP	Emden-Meyerhof-Parnas-Stoffwechselweg
FC	<i>fold change</i>
Fur	<i>ferric uptake regulator</i>
g	Gramm
Gly-Shunt	Glyoxylatshunt
GSH	reduziertes Glutathiol
GSH-P	Glutathion-Peroxidase
h	Stunde
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
Kat	Katalase
KbE	koloniebildende Einheit
L	Liter
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
Mb	Megabasenpaare
MIC	minimale inhibitorische Konzentration
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mQH ₂ O	MilliQ-Wasser
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
OD	optische Dichte
P	Peroxidase
PPP	Pentosephosphatweg

Prx	Peroxiredoxin
Pyr-Metabolismus	Pyruvat-Metabolismus
RIN	RNA <i>integrity number</i>
RLE	Relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RND	<i>resistance nodulation cell division</i>
rpm	<i>round per minute</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
rUTI	<i>recurrent UTI</i>
sRNA	<i>small RNA</i>
SOD	Superoxiddismutase
TCA-Zyklus	Tricarbonsäure-Zyklus
Te ^R	Tellurit-Resistenzdeterminate
T4P	Typ IV Pili
u. a.	unter anderem
μM	Mikromolar
μl	Mikroliter
üN	über Nacht
UTI	<i>urinary tract infection</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>

1 Einleitung

1.1 Harnwegsinfektionen

Der menschliche Harntrakt, in Abbildung 1 veranschaulicht, wird funktionell in harnbildende (Nieren) sowie harnableitende Organe (Nierenbecken, Harnleiter, Harnblase und Harnröhre) unterteilt. In den Nieren erfolgt mittels glomerulärer Filtration des Blutes und anschließender Resorption die Produktion von Urin, welcher in das Nierenbecken (*Pelvis renalis*) fließt. Der Harnleiter (*Ureter*) transportiert den Urin aus dem Nierenbecken in die Harnblase (*Vesica urinaria*). Über die Harnröhre (*Urethra*) gelangt der Urin aus der Harnblase nach außen (Faller & Schünke, 2008; Menche, 2012; Schultz-Lampel *et al.*, 2012).

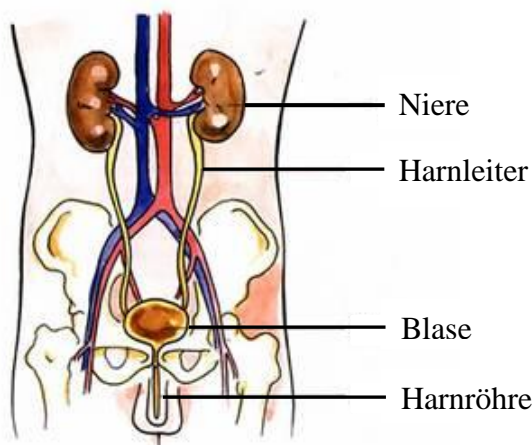


Abbildung 1: Darstellung des menschlichen Harntrakts (modifiziert nach N. Rosin, 2010).

Die charakteristische Gelbfärbung des Urins wird durch Urobiline verursacht (Goudas *et al.*, 2011). Bei diesen sogenannten Urochromen handelt es sich um Abbauprodukte des Bilirubins. Diese Verbindung geht aus der Degradation des Hämanteils vom Hämoglobin hervor (Thapa & Walia, 2007). Die Zusammensetzung des Urins ist tageszeit-, alters-, geschlechts- und diätabhängig. Generell setzt sich Urin aus folgenden Komponenten

zusammen: Wasser (95 % des Gesamtvolumens), Harnstoff (Endprodukt des Proteinstoffwechsels), Harnsäure (Abbauprodukt der Purine), Kreatinin (Endprodukte des Muskelstoffwechsels und aus der Nahrung), organische Säuren wie Oxalsäure und Zitronensäure, Aminosäuren, anorganische sowie organische Salze, Phosphate und D-Glukose (Pschyrembel, 2004). Ein in seiner Zusammensetzung veränderter Urin kann ein Hinweis auf eine Harnwegsinfektion (UTI – *urinary tract infection*) sein. Bei Patienten mit einer UTI lassen sich Leukozyten (Leukozyturie), Erythrozyten (Hämaturie) sowie eine Bakterienzellzahl von mehr als $1 \cdot 10^5$ Keimen/ml im Urin nachweisen. Des Weiteren ist der Proteingehalt erhöht, Nitrit (Abbauprodukt von Bakterien) kann detektiert werden und der Urin ist alkalisch (Gasser, 2009; Dagner-Kahrman, 2013).

Bei einer UTI handelt es sich um eine entzündliche Krankheit der Nieren und/oder der ableitenden Harnwege (Pschyrembel, 2004). UTIs werden in den meisten Fällen durch Bakterien, seltener durch Viren oder Pilze, verursacht (de Souza & Olsburgh, 2008). Es erfolgt eine Unterteilung in komplizierte und unkomplizierte UTIs. Funktionelle und strukturelle Abnormalitäten des Urogenitaltrakts sowie eine dauerhafte Katheterisierung prädisponieren für komplizierte UTIs (Lichtenberger & Hooton, 2008; Nicolle, 2013). Die Infektion eines normalen Urogenitaltrakts wird als unkompliziert eingestuft (Foxman, 2002). An dieser Art der UTI erkranken überwiegend Frauen (Giamarellou, 2001). Dabei liegt die Wahrscheinlichkeit, dass eine Frau an einer UTI erkrankt, bei 50 %. In 25 % der Fälle ist die Infektion wiederkehrend (*recurrent* UTI, rUTI) (Nosseir *et al.*, 2012).

An einer Infektion des Harntrakts erkrankt der Mensch im Laufe seines Lebens am häufigsten (Mittal *et al.*, 2009). Mit einem Anteil von 40 % zählen UTIs zu den meisten nosokomialen Infektionen. Zu 80 % stehen UTIs mit einem Harnwegskatheter im ursächlichen Zusammenhang und werden daher als Katheter-assoziierte Harnwegsinfektionen (CAUTI- *catheter-associated urinary tract infection*) bezeichnet (Nicolle, 2008). In Deutschland erhalten 12.9 % aller Patienten während ihres Krankenhausaufenthaltes einen Dauerkatheter (Martius *et al.*, 1999). Die tägliche Inzidenz einer neu erworbenen UTI liegt zwischen 3 und 10 %, sodass die Mehrheit der Patienten bei einer langzeitigen Katheterisierung (über 28 Tage) eine Infektion erwirbt. Bei einer

kurzzeitigen Katheterisierung (bis 7 Tage) beträgt das Infektionsrisiko 10 bis 50 % (Martius *et al.*, 1999, Stickler, 1999).

Escherichia coli ist der häufigste Verursacher von UTI. Dieser Mikroorganismus kann in 80 bis 90 % der unkomplizierten und in bis zu 20 % der komplizierten UTIs nachgewiesen werden (Moore *et al.*, 2002; Ronald, 2002). Bei komplizierten UTIs verschiebt sich das Erregerspektrum (Ronald, 2002) und es treten verstärkt *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterokokken* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis* und *Serratia marcescens* auf (Shigemura *et al.*, 2006, Ronald, 2002). Bei katheterisierten Patienten mit einer komplizierten UTI kann *P. aeruginosa* in 35 % der Fälle nachgewiesen werden (Mittal *et al.*, 2006; Shigemura *et al.*, 2006).

1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa (Familie *Pseudomonaceae*) ist ein ubiquitär vorkommendes Bakterium, das in aquatischen und terrestrischen Habitaten vorzufinden ist. Es ist ein Gram-negatives, fakultativ anaerobes, stäbchenförmiges γ -Proteobakterium mit einem hohen GC-Gehalt von etwa 67 %. *P. aeruginosa* bildet keine Sporen und seine polare Begeißelung befähigt es zur Fortbewegung (Madigan *et al.*, 2008). Charakteristisch für einige *P. aeruginosa*-Stämme ist die Produktion von wasserlöslichen Pigmenten wie dem Pyoverdin und dem Phenanzinderivat Pyocyanin. Ein weiteres Merkmal von *P. aeruginosa* ist die Bildung des süßlich-aromatischen Duftstoffs Aminoacetophenon (Hof und Dörries, 2009). Das 6.3 Mb große Genom von *P. aeruginosa* PAO1 wurde im Jahr 2000 vollständig sequenziert und besitzt 5570 annotierte Gene (Stover *et al.*, 2000). Innerhalb der Spezies *P. aeruginosa* variiert die Größe des Genoms zwischen 5.5 und 7.0 Mb. Diese Diversität wird durch das sogenannte akzessorische Genom verursacht (Klockgether *et al.*, 2011). Hierbei handelt es sich um extrachromosomale Elemente wie Plasmide, Transposons, Integrone und Bakteriophagen (Klockgether *et al.*, 2007). Die Summe der Gene, welche bei allen *P. aeruginosa*-Stämmen gefunden werden können, wird als Kerngenom bezeichnet (Wiehlmann *et al.*, 2007). Das Kerngenom ist hoch konserviert und die

Sequenzunterschiede betragen 0.5 bis 0.7 % (Klockgether *et al.*, 2011). *P. aeruginosa* ist metabolisch sehr vielfältig und nutzt ein weites Spektrum von organischen Verbindungen (Zucker, Fettsäuren, Di- und Tricarbonsäuren, Alkohole, Glycole, aromatische Verbindungen, Amine, Aminosäuren) als Kohlenstoff- und Energiequelle (Frimmersdorf *et al.*, 2010). Organische Säuren, wie Intermediate des Tricarbonsäurezyklus, verwertet es bevorzugt (Brock *et al.*, 2011). Der Abbau von Glucose erfolgt über den Entner-Doudoroff-Weg (Entner & Doudoroff, 1952; Brock *et al.*, 2011). Der Mikroorganismus kann unter aeroben und anaeroben Bedingungen Stoffwechsel betreiben. Steht Sauerstoff zur Verfügung, erfolgt die Energiegewinnung durch die aerobe Atmung. Unter anaeroben Bedingungen werden die alternativen Elektronenakzeptoren Nitrat und Nitrit vollständig zu molekularem Stickstoff reduziert. Dieser Stoffwechselweg wird als Denitrifikation bezeichnet (Zumft, 1997; Schreiber *et al.*, 2007). Stehen unter anaeroben Bedingungen keine alternativen Elektronenakzeptoren zur Verfügung, generiert *P. aeruginosa* durch die Fermentation von Arginin und Pyruvat Energie (Eschbach *et al.*, 2004; Schreiber *et al.*, 2006). Die metabolische Diversität von *P. aeruginosa* trägt zur Überlebensfähigkeit in diversen Habitaten und zur Besiedlung von einer Vielzahl von ökologischen Nischen bei (Frimmersdorf *et al.*, 2010).

P. aeruginosa ist ein opportunistisches Pathogen und kann neben dem Menschen auch Tiere und Pflanzen als Wirte besiedeln. Bei immungeschwächten Patienten löst es akute und chronische Infektionen aus (Hahn *et al.*, 2009). Zum Spektrum der Erkrankungen gehören unter anderem Pneumonien, Infektionen von Verbrennungswunden und des Urogenitaltrakts, Infektionen der Augen und Ohren, postoperative Wundinfektionen und Sepsen (Pschyrembel, 2004; Kayser *et al.*, 2010).

Da sich das Bakterium unter einfachsten Bedingungen im feuchten Milieu vermehren kann, stellen im Krankenhaus neben dem Sanitärbereich, Beatmungs- und Inhalationsgeräte sowie Dialyseeinrichtungen und Narkosegeräte extrakorporale Erregerreservoir dar (Kayser *et al.*, 2010). *P. aeruginosa* ist der häufigste Gram-negative Erreger, welcher bei nosokomialen Infektionen nachgewiesen werden kann. Die Behandlungen der durch *P. aeruginosa* verursachten Infektionen wird durch seine intrinsische Resistenz gegenüber

einer Vielzahl von Antibiotika und die rasche Entwicklung neuer Resistenzen erschwert (Van Delden & Iglewski, 1998; Obritsch *et al.*, 2005).

1.3 Pathogenität von *P. aeruginosa*

Die Fähigkeit eines Mikroorganismus Krankheiten zu verursachen wird als Pathogenität bezeichnet. Dabei wird der Ausprägungsgrad der Pathogenität (Virulenz) von zahlreichen Virulenzfaktoren beeinflusst (Hahn *et al.*, 2009). In Abbildung 2 sind zellgebundene und extrazelluläre Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* dargestellt.

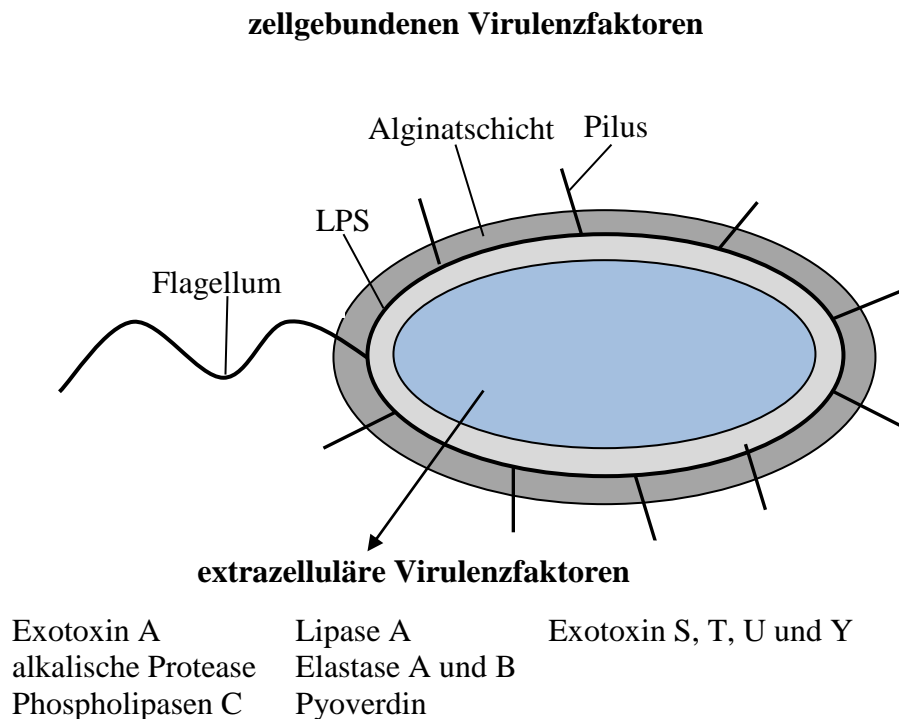


Abbildung 2: Zellgebundene und extrazelluläre Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* (modifiziert nach van Delden und Iglewski, 1998)

Bei einer *P. aeruginosa*-bedingten Infektion wird zwischen drei Phasen unterschieden: (1) Adhäsion und Kolonisation, (2) lokale Infektion und (3) Ausbreitung durch den Blutstrom (systemisches Krankheitsbild) (Strateva & Mitov, 2011). Des Weiteren ist die

Integrität von natürlichen Barrieren, wie beispielsweise von Schleimhäuten und Geweben, entscheidend bei der Initiation von Infektionen (Van Delden & Iglewski, 1998). Infektionsstudien zeigten, dass *P. aeruginosa* nur an durch Influenzaviren geschädigte murinen Luftröhrenepithellzellen adhärert (Ramphal *et al.*, 1980). Durch eine Katheterisierung können die Schleimhäute des Harntrakts geschädigt werden, wodurch die bakterielle Kolonisation und somit die Entstehung von Harnwegsinfektionen begünstigt wird (Kalsi *et al.*, 2003).

In der ersten Phase sind zellgebundene Virulenzfaktoren, wie Typ IV-Pili (T4P), Flagellen, Alginat und Lipopolysaccharid (LPS), essentiell. T4P und Flagellen interagieren mit zahlreichen Oberflächenstrukturen von eukaryotischen Zellen, weshalb sie zu den wesentlichen Adhäsinen gezählt werden (Bucior *et al.*, 2012; Haiko & Westerlund-Wikström, 2013). Flagellin vermittelt die Bindung von *P. aeruginosa* an Muc1 Muzine (Lillehoj *et al.*, 2001; Lillehoj *et al.*, 2002). Muc1 wird auf der Oberfläche von Epithelzellen exprimiert und kommt auf der Oberfläche von Zellen des hämatopoetischen Systems vor (Kato *et al.*, 2013). Für T4P ist beschrieben worden, dass sie an N-Glycane auf der apikalen Oberfläche von Epithelzellen der Lunge und an das Glycolipid asialo-GM1 von Epithelzellen binden (Schroeder *et al.*, 2001; Haiko & Westerlund-Wikström, 2013). In Studien konnte gezeigt werden, dass die T4P- und Flagellen-vermittelte Motilität die Virulenz von *P. aeruginosa* beeinflusst. Sie ermöglichen eine gerichtete Bewegung zur Wirtszelle und sind entscheidend für die Bildung von Biofilmen (Kipnis *et al.*, 2006; Duan *et al.*, 2011; Strateva & Mitov, 2011; Haiko & Westerlund-Wikström, 2013). Das Exopolysaccharid Alginat steigert die Adhärenz an das Epithel des Respirationstrakts (Kipnis *et al.*, 2006). Außerdem ist beschrieben worden, dass Alginat einen Schutz gegenüber Phagocytose, Antibiotika und der Immunantwort des Wirts vermittelt (Pier *et al.*, 2001; Leid *et al.*, 2005). Lipid A, eine Komponente des LPS von *P. aeruginosa*, trägt zur Adhärenz durch das Binden an asialoGM1 und CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) bei (Kipnis *et al.*, 2006).

Mit der Adhäsion und Kolonisation ist die erste Phase der Infektion abgeschlossen. Es schließt sich die Entwicklung einer lokalen Infektion und die Ausbreitung des Pathogens an. In diesen Phasen sind extrazelluläre Virulenzfaktoren von entscheidender Bedeutung.

Sie werden über sechs verschiedene Sekretionswege ausgeschleust (Lee *et al.*, 2005a). Das Exotoxin A, eine ADP-Ribosyltransferase, wird über das Sekretionssystem Typ II exportiert (Durand *et al.*, 2003) und gelangt über eine rezeptorvermittelte Endozytose in das Zytoplasma der Wirtszelle (Morlon-Guyot *et al.*, 2009). Dieses Enzym katalysiert die ADP-Ribosylierung des eukaryotischen Elongationsfaktors 2, wodurch die Proteinbiosynthese inhibiert wird (van Delden und Iglewski, 1998).

P. aeruginosa sekretiert ein breites Spektrum von hydrolytisch wirkenden Enzymen über den Typ II Sekretionsweg. Die proteolytischen Elastasen LasA und LasB degradieren synergistisch Elastin. Dieses Protein ist der Hauptbestandteil der menschlichen Lunge und verantwortlich für die Kontraktion und Expansion der Lunge. Zudem ist es eine Komponente von Blutgefäßen (Cotar *et al.*, 2010). Die Fähigkeit zur Hydrolyse von Elastin stellt einen wichtigen Faktor bei akuten Infektionen dar (Galloway, 1991; Van Delden & Iglewski, 1998). LasB degradiert noch weitere Gewebebestandteile wie Kollagen und interferiert mit dem Immunsystem des Wirts (Van Delden und Iglewski, 1998). Es inaktiviert die Immunglobuline A und G sowie zentrale Komponenten des Komplementsystems (Hoge *et al.*, 2010). Phospholipasen degradieren Phospholipide eukaryotischer Membranen und verursachen dadurch schwere Gewebeschäden (Ostroff *et al.*, 1990).

Die alkalische Protease, eine über das Typ I Sekretionssystem exportierte Metalloprotease (Guzzo *et al.*, 1991; Rawlings *et al.*, 2006), hydrolysiert die Gerinnungsfaktoren Fibrin und Fibrinogen sowie Bestandteile des Komplementsystems (Shibuya *et al.*, 1991). Gemeinsam mit LasB inaktiviert es das γ -Interferon und den Tumornekrosefaktor- α (Horvat & Parmely, 1988; Parmely *et al.*, 1990). Diese Zytokine sind wichtig für die Immunantwort des Wirtsorganismus (Hoge *et al.*, 2010).

Mit Hilfe des Typ III Sekretionsapparats werden sogenannte Effektorproteine (ExoS, ExoT, ExoU und ExoY) direkt in das Zytoplasma der Wirtszelle injiziert (Veesenmeyer *et al.*, 2010). ExoS und ExoT sind bifunktionale Zytotoxine, die über eine ADP-Ribosyltransferase-Domäne (ADPRT-Domäne) und über eine Rho GTPase-aktivierende-Domäne (Rho GAP-Domäne) verfügen. Über die Rho GAP-Domäne inaktivieren ExoS und ExoT Rho-GTPasen (Aktories & Barbieri, 2005; Engel & Balachandran, 2009), welche

unter anderen den Aufbau und die Organisation des Aktin-Zytoskeletts regulieren (Etienne-Manneville & Hall, 2002). Über die Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts nehmen diese beiden Zytotoxine Einfluss auf wichtige zelluläre Prozesse, wie die Zellbewegung, die Phagozytose und die Zytokinese (Van Aelst & D'Souza-Schorey, 1997; Heasman & Ridley, 2008). Die ADPRT-Domäne des ExoS trennt *tight junctions*, eine Verbindung zwischen eukaryotischen Epithelzellen. Dies erleichtert wiederum die Penetration durch epitheliale Barrieren (Engel & Balachandran, 2009; Hauser, 2009). Außerdem induziert diese Domäne die Apoptose der Wirtszellen (Jia *et al.*, 2006). Die ADPRT-Domäne von ExoT hingegen blockiert die Phagozytose und inhibiert zusammen mit der RhoGAP-Domäne die Wundheilung (Hauser, 2009). ExoU besitzt eine Phospholipase-Aktivität, die durch die Hydrolyse von Membranlipiden zur Apoptose der Wirtszellen führt (Sato *et al.*, 2006; Hauser, 2009). Bei ExoY handelt es sich um eine Adenylatcyclase, welche den zytosolischen cAMP-Spiegel erhöht (Yahr *et al.*, 1998). Es ist beschrieben worden, dass eine erhöhte Menge von zytosolischem cAMP zu einer verstärkten Permeabilität der Lunge führt (Sayner *et al.*, 2004).

Neben den extrazellulären Enzymen sekretiert *P. aeruginosa* weitere Virulenzfaktoren. Das Phenanzinderivat Pyocyanin inhibiert Katalasen in den Epithelzellen der Lunge (O'Malley *et al.*, 2003) und oxidiert Glutathion (O'Malley *et al.*, 2004). Beides führt durch die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies und durch eine Verminderung des wirtseigenen Schutzmechanismus gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies zur Auslösung von oxidativem Stress in den umliegenden Zellen (Gloyne *et al.*, 2011; Lau *et al.*, 2004). Bei *P. aeruginosa* ist Eisen essentiell für die Entwicklung von Biofilmen und für die Virulenz. Im Harntrakt liegen allerdings Eisen-limitierende Bedingungen vor (Mittal *et al.*, 2008). Tielen und Kollegen zeigten, dass ein komplexes regulatorisches Netzwerk mit dem Eisenaufnahmeregulator Fur an dessen Spitze bei *P. aeruginosa* eine Adaptation an den Eisenmangel vermittelt (Tielen *et al.*, 2013). Dieses Netzwerk kontrolliert u.a. die Produktion von Pyoverdinin und Pyochelin (Siderophore), welche dreiwertiges Eisen komplexieren und es der Bakterienzelle als zweiwertiges Eisen zur Verfügung stellt. In Zusammenarbeit mit weiteren Faktoren wird dadurch eine adäquate Versorgung mit

essentiellern Eisen sichergestellt (Upritchard *et al.*, 2007; Mittal *et al.*, 2008; Tielen *et al.*, 2013).

1.4 Antibiotika

Der Begriff Antibiotika impliziert sowohl Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen als auch halb- und totalsynthetische Substanzen. Entweder hemmen diese Verbindungen das Wachstum von Mikroorganismen (bakteriostatische Wirkung), töten sie ab (bakteriozide Wirkung) oder verursachen deren Auflösung (bakteriolytische Wirkung) (Madigan *et al.*, 2008). All diesen Substanzen ist gemein, dass sie nach dem sogenannten Ehrlich'schem Prinzip der selektiven Toxizität wirken. Demnach greifen Antibiotika prokaryotische Strukturen bzw. Vorgänge an, die in eukaryotischen Zellen fehlen oder wesentlich anders aufgebaut sind bzw. anders ablaufen (Madigan *et al.*, 2008; Wainwright, 2008). Die Proteinbiosynthese, die DNA-Replikation sowie die Biosynthese der Zellwand stellen in bakteriellen Zellen geeignete Zielstrukturen dar (Walsh, 2003). Zur Gruppe der Proteinbiosynthese-Hemmer gehören Aminoglykoside, wie Kanamycin und Streptomycin, Makrolide, wie Erythromycin und Azithromycin sowie Tetrazykline (Chopra & Roberts, 2001; Hansen *et al.*, 2002; Hermann, 2007). Chinolone, wie Ofloxacin und Norfloxacin, unterbrechen die DNA-Replikation (Samanidou *et al.*, 2003; Aldred *et al.*, 2014). Glycopeptide, wie Vancomycin und Teicoplanin sowie Beta-Laktame, zu deren Klasse Penicilline, Cephalosporine sowie Carbapeneme zählen, inhibieren die Zellwandsynthese (Kahne *et al.*, 2005; Wilke *et al.*, 2005). Im folgenden Abschnitt wird der Wirkmechanismus der in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika näher beschrieben.

Tobramycin zählt zu den Aminoglykosiden. Bei dieser Antibiotikaklasse handelt es sich um hydrophile Moleküle, welche aus einem zentralen Aminocyclitol-Ring (Streptidin oder 2-Desoxystreptamin) bestehen, der glykosidisch mit einem bzw. mehreren Aminoazuckern verbunden ist (Magnet & Blanchard, 2005; Jana & Deb, 2006). Dabei gehört Tobramycin zu den zweifach substituierten 2-Desoxystreptamin-Derivaten (Hermann, 2007). Die primäre Zielstruktur ist die 30S-Untereinheit prokaryotischer Ribosomen (Avent *et al.*,

2011). Tobramycin bindet an die Aminoacyl-Stelle der 16S rRNA (Schroeder *et al.*, 2000; Llano-Sotelo *et al.*, 2002). Eine Struktur, die essentiell für die Erkennung der mRNA und beladenen tRNA während der Translation ist (Vicens & Westhof, 2002). Die Bindung induziert ein ungenaues Ablesen der mRNA, was zur Entstehung von fehlerhaften Proteinen führt (Kohanski *et al.*, 2010). Es ist beschrieben worden, dass einige dieser Proteine in die Cytoplasmamembran inkorporiert werden. Der dadurch eintretende Verlust der Membranintegrität führt zu einem weiteren Eindringen des Antibiotikums, wodurch die Zelle stärker geschädigt wird (Vakulenko & Mobashery, 2003).

Ciprofloxacin gehört zur Gruppe der Fluorchinolonen. Fast alle klinisch relevanten Fluorchinolonen sind aus einem Chinoloncarbonsäure-Grundkörper mit einer Flour-Substitution an der Ring-Position 6 aufgebaut. Zur Varianz tragen weitere Gruppen an den verschiedenen Ring-Positionen bei, die zusätzlich die antibakterielle Aktivität sowie die Pharmakokinetik beeinflussen (Saager, 2008). Die bakterielle Topoisomerase Typ II, auch Gyrase genannt, und Topoisomerase Typ IV sind die Zielstruktur von Fluorchinolonen (Aldred *et al.*, 2014). Die Gyrase und Topoisomerase Typ IV setzen sich jeweils aus zwei Untereinheitenpaaren zusammen. Die Untereinheiten der Gyrase sind GyrA und GyrB. Bei der Topoisomerase Typ IV handelt es sich um ParC und ParE (Blondeau, 2004). Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit besitzen sie unterschiedliche physiologische Funktionen (Aldred *et al.*, 2014). Die Gyrase sorgt für eine negative Überspiralisierung der DNA und löst die Torsionsspannung vor der Replikationsgabel und dem Transkriptionskomplex. Die Hauptaufgabe der Topoisomerase Typ IV ist die Trennung (Decantenierung) der bei der Replikation entstandenen Tochterchromosomen (Hawkey, 2003). Dazu fügen beide Topoisomerasen Doppelstrangbrüche in das bakterielle Chromosom ein (Aldred *et al.*, 2014). Die Bindung von Ciprofloxacin an den Enzym-DNA-Komplex bewirkt eine Fixierung des Komplexes (Drlica *et al.*, 2008). Bei bereits durch den Komplex geschnittener DNA wird dadurch die Religation verhindert, wobei eine zunehmende Anzahl an Doppelstrangbrüchen die SOS-Antwort induziert (Drlica *et al.*, 2008; Aldred *et al.*, 2014). Zusätzlich wird das Voranschreiten der Replikationsgabel und des Transkriptionskomplexes blockiert. Dies führt zur Inhibition des bakteriellen Wachstums. Beides zusammen verursacht den Zelltod (Blondeau *et al.*, 2004; Drlica *et al.*, 2009).

Ceftazidim gehört zu den Cephalosporinen, welche zur Gruppe der klinisch relevanten Beta-Laktam-Antibiotika gezählt werden (Fish, 2002; Madigan *et al.*, 2008). Bei Cephalosporinen ist der Beta-Laktam-Ring mit einem sechsgliedrigen Dihydrothiazinring verbunden. Dadurch ist der Beta-Laktam-Ring unempfindlicher gegenüber Beta-Laktamasen (Giguère *et al.*, 2013). Beta-Laktam-Antibiotika sind dem Substrat von Transpeptidasen strukturell ähnlich (Macheboeuf *et al.*, 2006). Durch deren Bindung werden diese für die Synthese der bakteriellen Zellwand relevanten Enzyme inhibiert (Wilke *et al.*, 2005). Die Quervernetzung in der Peptidoglykanschicht wird dadurch verhindert. Die Folge ist eine mechanisch geschwächte Zellwand, die die Lyse und damit den Zelltod begünstigt (Jenni, 2001).

In dieser Arbeit wurden Tobramycin, Ciprofloxacin und Ceftazidim verwendet, da sie zur Behandlung von *P. aeruginosa*-bedingten Infektionen eingesetzt werden (Talan *et al.*, 2004; Obritsch *et al.*, 2005; Rossolini & Mantengoli, 2005; Driscoll *et al.*, 2007).

1.5 Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa*

P. aeruginosa ist resistent gegenüber einem breiten Spektrum an Antibiotika und entwickelt während einer Behandlung mit Antibiotika schnell neue Resistenzen (van Delden und Iglewski, 1998, Obritsch *et al.*, 2005). Allein letzteres führt zu einer Verdopplung der Dauer des Krankenhausaufenthalts sowie der Behandlungskosten (Dimatatac *et al.*, 2003). Außerdem konnte belegt werden, dass sich die Mortalität, Morbidität, Behandlungskosten und die Notwendigkeit von chirurgischen Eingriffen sowie die Dauer des Krankenhausaufenthalts bei einer Infektion mit multiresistenten *P. aeruginosa*-Stämmen erhöht (Morales *et al.*, 2012; Lister *et al.*, 2009). Damit stellen *P. aeruginosa*-bedingte Infektionen eine erstzunehmende therapeutische Herausforderung dar (Lister *et al.*, 2009). Ein kombinatorischer Effekt aus mehreren Faktoren trägt dazu bei. Durch die geringe Permeabilität der äußeren Membran wird die Penetration von Antibiotika reduziert, wodurch anschließende Resistenzmechanismen effektiver werden (Nicas & Hancock, 1983; Breidenstein *et al.*, 2011). Die Membranpermeabilität von *P. aeruginosa* ist

12- bis 100- fach geringer als bei *E. coli* (Hancock, 1998). Effluxsysteme sind ein weiterer Mechanismus, um die Akkumulation von Antibiotika zu minimieren (Lister *et al.*, 2009). Dabei wird zwischen fünf unterschiedlichen Gruppen von Effluxpumpen unterschieden (Van Bambeke *et al.*, 2000). Mittels Sequenzanalyse konnten im Genom von *P. aeruginosa* Vertreter aller Gruppen nachgewiesen werden, wobei die Transportsysteme der RND-Gruppe (*resistance nodulation cell division*) am häufigsten vorkommen (Stover *et al.*, 2000). Für *P. aeruginosa* sind zehn dieser Effluxsysteme beschrieben worden (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY, MexJK, MexGHI-OpmD, MexVW, MexPQ-OmpE, MexMN und TriABC). In der Publikation von Lister *et al.* ist detailliert aufgelistet welche Antibiotika von den Effluxsystemen transportiert werden (Lister *et al.*, 2009).

Ein weiterer Resistenzmechanismus besteht in der Inaktivierung von Antibiotika durch Modifikation oder Degradation. Für *P. aeruginosa* ist bekannt, dass Aminoglykoside, wie Kanamycin, Neomycin, Gentamycin und Streptomycin, durch die enzymatisch katalysierte Übertragung von Acetyl-, Adenyl- und Phosphat-Gruppen verändert und dadurch unwirksam werden (Poole, 2005). Beta-Laktamasen hydrolysieren die Amidbindung des Beta-Laktam-Rings, wodurch Beta-Laktam-Antibiotika, wie Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme, ihre Wirksamkeit verlieren (Poole, 2004). *P. aeruginosa* verfügt über zwei chromosomal kodierte Beta-Laktamasen: PoxB und AmpC (Kong *et al.*, 2010). Bei PoxB handelt es sich um eine Oxacillinase (Klasse D Beta-Laktamase) und *ampC* kodiert für eine Cephalosporinase (Klasse C Beta-Laktamase) (Kong *et al.*, 2005). Darüber hinaus konnten in einigen *P. aeruginosa*-Stämmen plasmidkodierte Beta-Laktamasen identifiziert werden, deren Übertragung mittels horizontalem Gentransfers erfolgen (Breidenstein *et al.*, 2011). Für *P. aeruginosa* sind eine Vielzahl an erworbenen Beta-Laktamasen beschrieben worden. Besonders häufig konnten die Penicillinasen PSE-1 und PSE-4 (Klasse A Beta-Laktamasen) nachgewiesen werden (Livermore, 2002; Bush & Jacoby, 2009; Lister *et al.*, 2009). Sie degradieren Penicilline sowie Cefoperazone (Endimiani *et al.*, 2006).

Zusätzlich tragen mutagene Veränderungen der Angriffsziele von Antibiotika zu einer Steigerung der Resistenz bei (Lister *et al.*, 2009; Breidenstein *et al.*, 2011). Mutationen innerhalb der Gene *gyrA* und *gyrB* (Gyrase) sowie *parC* und *parE* (Topoisomerase IV)

führen zur Modifikation innerhalb der Bindestelle von Fluorchinolonen, wodurch diese mit einer geringeren Affinität binden (Dunham *et al.*, 2010; Pasca *et al.*, 2012). Eine durch eine Mutation induzierte Überexpression von Effluysystemen wie MexCD-OprJ und MexEF-OprN erhöht die Resistenz gegenüber Fluorchinolonen und einigen Beta-Laktamen (Livermore, 2002; Stickland *et al.*, 2010). Außerdem ist bekannt, dass eine Mutation innerhalb des Gens *ampD* (Amidase) zu einer erhöhten Expression von *ampC* (Beta-Laktamase) führt, was wiederum die Resistenz gegenüber Beta-Laktam-Antibiotika steigert (Alvarez-Ortega *et al.*, 2010). Des Weiteren tragen strukturelle Veränderungen, wie z.B. die Methylierung der 16S rRNA (Komponente der ribosomalen 30S Untereinheit), zur Resistenz gegenüber Aminoglykosiden bei (Doi & Arakawa, 2007).

Neben genetisch-vermittelten Resistenzmechanismen ist für *P. aeruginosa* auch eine adaptive Resistenz beschrieben worden. Dabei handelt es sich um ein Phänomen, bei dem Antibiotika selbst transiente Resistenzen induzieren (Skiada *et al.*, 2011). Eine durch Polymyxine ausgelöste Veränderung von LPS steigert die Resistenz gegenüber diesen antimikrobiellen Wirkstoffen (Fernández *et al.*, 2010, 2012). Zudem ist bekannt, dass Aminoglykoside die Expression des *mexXY*-Operons erhöhen, wodurch diese Antibiotika schneller aus den Zellen ausgeschleust werden (Breidenstein *et al.*, 2011; Skiada *et al.*, 2011). Durch eine Beeinflussung der Expressionsrate von bestimmten Genen steigern auch Beta-Laktam-Antibiotika, wie Cefoxitin und Imipenem, die Resistenz. Sie bewirken eine erhöhte Produktion der Beta-Laktamase AmpC (Lister *et al.*, 2009).

Eine Untersuchung des Resistenzprofils von 32 uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten zeigte, dass 26 Isolate resistent gegenüber 8 bis 15 der insgesamt 23 getesteten Antibiotika sind. Weitere 6 Isolate zeigten eine Resistenz gegenüber 21 Antibiotika und wurden damit als multiresistent eingestuft (Narten *et al.*, 2012). Dieser hohe Anteil an Resistenzen verdeutlicht die Notwendigkeit von neuen therapeutischen Strategien bei der Behandlung von *P. aeruginosa*-bedingten Infektionen.

1.6 Tellurit

Ein Ansatz bei der Therapie von *P. aeruginosa*-bedingten Infektionen ist die Zugabe von Tellurit (Molina-Quiroz *et al.*, 2012).

Die therapeutischen und diagnostischen Anwendungsmöglichkeiten von Tellurit sind seit längerem bekannt. Alexander Fleming beschrieb im Jahr 1932 die antimikrobielle Wirkung von Tellurit (Fleming, 1932). Außerdem konnte gezeigt werden, dass es für den Nachweis spezifischer Bakterien geeignet ist (Gosio, 1905; King & Davis, 1913). Aufgrund dessen wurde Tellurit u.a. zur Identifizierung von Tuberkuloseerregern eingesetzt (Corper, 1915). Noch heute wird Tellurit zur Identifikation von *Corynebacterium diphtheriae* und *Staphylococcus aureus* verwendet (Efstratiou *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2005). Die Nachweismethoden basieren auf der Reduktion von Tellurit zu schwarzem Tellur, welcher in der Cytoplasmamembran eingelagert wird (Taylor, 1999; Chien *et al.*, 2011).

Bei dem wasserlöslichen Tellurit handelt es sich um die oxidierte Form des Elements Tellur. Bereits ab einer Konzentration von weniger als 1 µg/ml (4 µM) wirkt es bei den meisten Mikroorganismen toxisch (Taylor, 1999; Di Tomaso *et al.*, 2002). Dagegen sind Metalle und Metalloide wie Selen, Chrom, Eisen, Quecksilber, Cadmium sowie Kupfer erst ab einer 100-fachen Konzentration toxisch (Nies, 1999).

Tellurit ist ein starkes Oxidationsmittel. Es wird daher angenommen, dass dies ein Grund für die beobachtete hohe Toxizität von Tellurit ist (Taylor *et al.*, 1999). Turner *et al.* zeigten, dass Tellurit bevorzugt mit reduziertem Glutathion (GSH) reagiert. Daneben oxidiert Tellurit weitere Thiole wie z.B. das Coenzym A (CoASH). Glutathion ist an einem breiten Spektrum von zellulären Prozessen beteiligt, weswegen eine hohe intrazelluläre Konzentration dieser Komponente essentiell ist (Turner *et al.*, 2001). Des Weiteren wird vermutet, dass die durch die Reduktion von Tellurit vermittelte Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) ursächlich für die Toxizität dieses Minerals ist (Pérez *et al.*, 2007). Die entstandenen ROS führen zu Schäden an der DNA, an Proteinen sowie an Lipiden und zur Zerstörung von Eisen-Schwefel-Zentren (Cabiscol *et al.*, 2000; Chasteen *et al.*, 2009).

Es ist wenig über die Mechanismen, welche eine Resistenz gegenüber Tellurit vermitteln, bekannt. Bisher wurden fünf Resistenzdeterminanten (Te^{R}) in Gram-negativen Mikroorganismen identifiziert. Sie sind entweder chromosomalen Ursprungs oder liegen auf Plasmiden kodiert vor (Chasteen *et al.*, 2009). Zu diesen Determinanten zählt u.a. das *tehAB*-Operon, welches im Genom von *E. coli* nachgewiesen werden konnte (Taylor *et al.*, 1994). Bei TehA handelt sich um ein integrales Membranprotein, welches Homologien zum C4-Dicarboxylat-Transporter/ Maleinsäure-Transportprotein aufweist (Zannoni *et al.*, 2008). TehB besitzt Ähnlichkeiten zur S-Adenosylmethionin (SAM)-abhängigen Methyltransferase und es konnte gezeigt werden, dass es Tellurit methyliert (Dyllick-Brenzinger *et al.*, 2000; Choudhury *et al.*, 2011). Bei dem *ter*-Operon (*terXYW* und *terZABCDEF*) handelt es sich um eine weitere Resistenzdeterminante (Chasteen *et al.*, 2009). Die Gene *terBCDE* sind der minimalste Anteil des Operons, welcher eine Resistenz gegenüber Tellurit vermittelt (Kormutakova *et al.*, 2000). Bisher ist wenig über die Art der Beteiligung der *ter*-Determinanten an der Telluritresistenz bekannt (Zannoni *et al.*, 2008). Ko-Lokalisationsstudien lieferten Hinweise darauf, dass TerB an der Reduktion von Tellurit involviert ist (Alekhina *et al.*, 2011). Außerdem konnte gezeigt werden, dass TerW an der Kontrolle der Expression vom *terZABCDEF* Operon beteiligt ist (Valkovicova *et al.*, 2011). Die zytoplasmatischen Proteine KlaA und KlaB sowie das integrale Membranprotein TelB stellen eine weitere Te^{R} -Determinante dar. Alle drei Komponenten sind für eine Resistenz gegenüber Tellurit erforderlich (Zannoni *et al.*, 2008). Es ist beschrieben, dass sie die Zelle vor der Tellurit-vermittelten Oxidation von Glutathionen schützen (Turner, 2001). Die Cysteinsynthase CysK, eine Komponente des Cysteinestoffwechsels, wurde als eine weitere Te^{R} -Determinante beschrieben (Vásquez *et al.*, 2001). Cysteine sind ein Teil von wichtigen Reduktionsmitteln wie Glutathionen und werden für die Synthese und Reparatur von Eisen-Schwefel-Zentren benötigt (Fuentes *et al.*, 2007). Damit kann den Folgen der Telluritreduktion entgegen gewirkt werden (Chasteen *et al.*, 2009). Die fünfte Te^{R} -Determinante stellt das Gen *tpmT* dar, welches für eine SAM-abhängige Thiopurin-Methyltransferase kodiert. Es wird angenommen, dass dieses Enzym durch die Umwandlung von Tellurit in die flüchtige Form Dimethyltellurit zur Telluritresistenz beiträgt (Zannoni *et al.*, 2008).

1.7 Reaktive Sauerstoffspezies

P. aeruginosa generiert bevorzugt metabolische Energie durch die aerobe Atmung (Frangipani *et al.*, 2008). Dieser Prozess impliziert eine univalente Reduktionsserie von molekularem Sauerstoff und kann schädlich für die Zelle werden, da beispielsweise aberrierende Elektronenflüsse innerhalb der Elektronentransportkette zur Produktion von ROS führen können (Salunkhe *et al.*, 2005; Imlay, 2013). Der Begriff ROS beinhaltet freie Sauerstoffradikale wie Superoxid ($O_2^{\cdot-}$)-, Hydroxyl (HO^{\cdot})-, Peroxyl (RO_2^{\cdot})- und Hydroperoxyl (HO_2^{\cdot})-Radikale und nicht-radikalische Sauerstoffderivate wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), hypochlorige Säure ($HOCl$) und Ozon (O_3) (Bayir, 2005). Neben der endogenen Entstehung stellen exogenen ROS-Quellen ein zusätzliches Problem dar. Im Rahmen der Immunantwort des Wirts erfolgt u.a. eine Eliminierung von Pathogenen durch von Makrophagen und Neutrophilen erzeugte ROS (Bogdan *et al.*, 2000; Fang, 2004).

Im folgenden Abschnitt wird näher auf Wasserstoffperoxid sowie Hydroxyl- und Superoxid-Radikale eingegangen, da es sich hierbei um die wahrscheinlichsten Formen von intrazellulären ROS handelt, welche problematisch für aerob lebende Mikroorganismen sind (Imlay, 2013). Wasserstoffperoxid zeichnet sich durch eine geringe Reaktivität und eine vergleichsweise große Diffusionsweite aus (Reiter *et al.*, 2001; Bienert *et al.*, 2006). Hydroxyl-Radikale sind die chemisch aktivste Form (Lushchak, 2011). Sie besitzen eine sehr niedrige Halbwertszeit, was dazu führt, dass sie nur mit Verbindungen in unmittelbarer Nähe zu ihrem Entstehungsort reagieren können (Buonocore *et al.*, 2010). Superoxid-Radikale besitzen eine niedrige Halbwertszeit und sind bedingt durch ihre Ladung nicht permeabel (Grant & Loake, 2000; Imlay, 2003). Sie gelten als primäre ROS, deren Interaktion mit anderen Molekülen die Bildung von weiteren ROS bewirkt (Buonocore *et al.*, 2011). Superoxid-Radikale sind beispielsweise an der Entstehung von Hydroxyl-Radikalen beteiligt. Die von dieser Radikalform katalysierte Oxidation von $[4Fe-4S]$ -Cluster führt zur Freisetzung von zweiwertigem Eisen, welches mit Wasserstoffperoxid unter Bildung von Hydroxyl-Radikalen reagiert (Fenton Reaktion, siehe Abbildung 3) (Prousek, 2007; Valko *et al.*, 2007).

Die hohe Oxidationskraft sowie die Fähigkeit als Reduktionsmittel zu agieren, sind ursächlich für die Toxizität von ROS (Fones & Preston, 2011). Angriffspunkt dieser hoch reaktiven Verbindungen sind Proteine, DNA und Lipide (Cabiscol *et al.*, 2000).

Superoxid-Radikale und Wasserstoffperoxid bewirken durch die Oxidation von Eisen-Schwefel-Zentren die Inaktivierung von [4Fe-4S]-Cluster-abhängigen Dehydratasen (Imlay, 2013). Zu dieser Gruppe von Enzymen zählen beispielsweise Aconitase und Fumarase, welche Schlüsselenzyme des Citratzyklus sind. Neben der dadurch verursachten metabolischen Beeinträchtigung wird zusätzlich zweiwertiges Eisen freigesetzt, welches die Generierung von Hydroxyl-Radikalen fördert (Imlay, 2006; Imlay, 2008). Nur diese Radikalf orm kann direkt mit biologischen Makromolekülen reagieren (Touati, 2000). Hydroxyl-Radikale oxidieren Aminosäurereste von Proteinen (Stadtman & Levine, 2000). Die durch die Oxidation verursachten Modifikationen von Aminosäuren verändern die Proteinstruktur, was zum Verlust der Funktion führen kann (Cabiscol *et al.*, 2000). Zudem oxidieren Hydroxyl-Radikale die Desoxyribose und die Basen der DNA (Imlay, 2013). Dabei sind über 20 verschiedene oxidative DNA-Schäden beschrieben worden (Cooke *et al.*, 2003). Besonders bekannt ist das mutagene Produkt 8-Hydroxyguanin. Es bildet mit Adenin ein Basenpaar, wobei diese Fehlpaarungen nicht von der DNA Polymerase erkannt werden (Hogg *et al.*, 2005). Sauerstoffradikale reagieren mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren innerhalb von Membranen und initiieren dadurch eine Kettenreaktion, die zur Degradation von Lipiden führt (Lipidperoxidation) (Abuja & Albertini, 2001; Sultana *et al.*, 2006). Primär wirkt sich dieser Prozess auf die Membraneigenschaften aus. Es kommt u.a. zu einer Veränderung der Fluidität und der Permeabilität sowie zu einer Störung der membrangebundenen Proteine (Cabiscol *et al.*, 2000). Zusätzlich ist die Entstehung von weiteren reaktiven Molekülen, wie Malondialdehyd, beschrieben worden, welches weitere DNA-Schäden verursacht (Marnett, 2002).

Eine erhöhte intrazelluläre Konzentration an ROS wird als oxidativer Stress bezeichnet (Mailloux & Harper, 2011), wobei oxidativer Stress durch ein Ungleichgewicht zwischen ROS-Produktion und -Detoxifizierung gekennzeichnet ist (Almeida *et al.*, 2006)

In erster Linie vermitteln antioxidative Enzyme einen Schutz vor den ROS-vermittelten Schäden (Fones & Preston, 2011). Beispiele für die enzymatische Inaktivierung von ROS

sind in Abbildung 3 dargestellt. Die Superoxiddismutase katalysiert die Umwandlung von Superoxid-Radikalen in Wasserstoffperoxid (Herrero *et al.*, 2008), welches von Katalasen, Peroxiredoxinen und Peroxidasen in Wasser umgesetzt wird (Lesniak *et al.*, 2002).

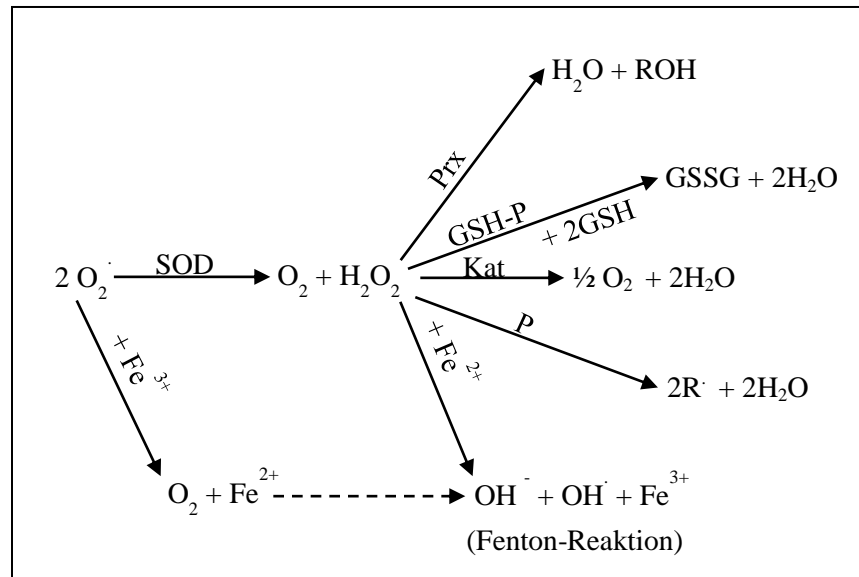


Abbildung 3: Enzymatische Inaktivierung von reaktiven Sauerstoffspezies und Fenton-Reaktion (modifiziert nach Posselt, 2006). SOD: Superoxiddismutase, Prx: Peroxiredoxin, GSH-P: Glutathion-Peroxidase, Kat: Katalase, P: Peroxidase.

Für *P. aeruginosa* sind zwei SODs (Cofaktor Eisen oder Mangan), drei Katalasen (KatA, KatB, KatC) und vier Peroxiredoxine (AhpA, AhpB, AhpCF und Ohr) beschrieben worden (Ochsner *et al.*, 2000). Daneben sind auch nichtenzymatische Antioxidantien bekannt. Dazu zählen u.a. Vitamin C und E sowie Glutathion. Letzteres kann direkt Hydroxyl-Radikale neutralisieren (Lushchak, 2001, 2011)

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

P. aeruginosa kann ein breites Spektrum an Infektionen verursachen. Dazu gehört unter anderem die Harnwegsinfektion. Mit einem Anteil von 40 % zählt diese Art der Infektion zu den häufigsten nosokomialen Infektionen. Dieses Bakterium ist gegenüber einer Vielzahl an Antibiotika resistent und entwickelt während einer Antibiotikatherapie schnell neue Resistenzen. Dadurch wird die Behandlung von *P. aeruginosa*-bedingten Infektionen erschwert. Die Multiresistenz von klinisch relevanten Bakterien erfordert neue therapeutische Strategien. Ein neuer Ansatz besteht in der Kombination von Antibiotika mit Adjuvantien wie z.B. Metallen in geringer Konzentration.

In den Genomen der uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate MH19, MH27, MH38 und RN21 sind Gene vorhanden, welche in den Genomen der Referenzstämmen nicht identifiziert werden konnten. Ein Teil dieser Gene, so genannte Singletons, konnte mit einer Resistenz gegenüber Schwermetallen in Verbindung gebracht werden. Es sollte die Sensitivität von den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten gegenüber Schwermetallen ermittelt werden und überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen den Singletons und der Sensitivität besteht. Des Weiteren sollte in die Arbeit der Einfluss von Tellurit auf die Wirksamkeit von Ceftazidim, Ciprofloxacin und Tellurit auf die uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate MH19, MH27, MH38 und RN21 sowie bei dem Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 getestet werden. Diese mögliche Kombinationstherapie setzt voraus, dass Tellurit nicht toxisch für humane Zelle ist. Deshalb sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob die eingesetzten Telluritkonzentrationen toxisch für humane Epithellzellen sind. Durch die Analyse des Transkriptionsprofils sowie des zentralen Kohlenstoffwechsels von *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit sollte die Wirkung von Tellurit auf zelluläre Prozesse genauer untersucht werden, um Rückschlüsse auf das Wirkprinzip zu ziehen. Dazu sollte ebenfalls die intrazelluläre ROS-Menge in Anwesenheit von Tellurit und Antibiotika bei den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten MH19, MH27, MH38 und RN21 und dem Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 quantifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Hilfsmittel

Die für die Durchführung der Experimente verwendeten Geräte sind samt Modellbezeichnung, Hersteller und Firmensitz in Tabelle 1 aufgelistet. In dieser Arbeit wurden bestimmte Materialien und kommerzielle Kits regelmäßig verwendet. Diese sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Modell	Hersteller, Firmensitz
Autoklav	EL8350	Systec, Wettenberg, Deutschland
Bioanalyzer	Bioanalyzer 2100	Agilent, Waldbronn, Deutschland
Brutschrank	Function Line Hera Cell	Heraeus, Hanau, Deutschland Heraeus, Hanau, Deutschland
DNA Microarray Scanner	High Resolution Scanner	Agilent, Waldbronn, Deutschland
Hybridisierungs- ofen	Typ 1012	Shel Lab, Cornelius, USA
Luminometer	Biocounter M2010	Lumac, Niederlande
Mehrkanalpipette	Transferpipette®	Brand, Wertheim, Deutschland
Mikroskop	Axiovert 25 Axioskop	Zeiss, Oberkoch, Deutschland Zeiss, Oberkoch, Deutschland
Mikrotestplatten- Lesegerät	Varioskan Flash	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pH-Messgerät	pH211 Microprocessor	Hanna Instruments, Kehl, Deutschland
Photometer	Biomate 3	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland

Tabelle 1: Fortsetzung

	Nanodrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Rollinkubator	RM5	CAT M. Zipperer GmbH, Staufen, Deutschland
Reinstwasseranlage	Milli-Q System	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Sicherheitswerkbank	HeraSafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
	Heraeus Lamin Air HLB 2472	Heraeus, Hanau, Deutschland
Schüttelbad	Type AT15	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Schüttelinkubator	Titramax 1000	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Thermocycler	MyCycler™ Thermal Cycler	Bio-Rad, München, Deutschland
Thermoschüttler	Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Waagen	Feinwaage Kern, ALJ 160-4NM	Kern & Sohn GmbH, Ballingen, Deutschland
	Kern 572	Kern & Sohn GmbH, Ballingen, Deutschland
Wasserbad	C12 Thermoboy	mgw Lauda, Königshofen, Deutschland
Zentrifugen	Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau, Deutschland
	Mini Spin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Allegra X-12R Centifuge	Beckman Coulter, Brea, USA

Tabelle 2: Spezielle Materialien und kommerzielle Kits

Produkt	Hersteller, Firmensitz
Anaeroben-Flaschen, 125 ml, mit Membranverschluss	Zscheile & Klinger GmbH, Hamburg, Deutschland
Antibiotika-Testplättchen, Ø 9 mm	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
<i>10 x Blocking agent</i>	Agilent, Waldbronn, Deutschland
Einmalkanülen	Rose GmbH, Trier, Deutschland
25 x Fragmentierungspuffer	Agilent, Waldbronn, Deutschland
2 x Hybridisierungspuffer	Agilent, Waldbronn, Deutschland
<i>Glass Beads</i> , Ø 70-125 µm	Kuhmichel, Ratingen, Deutschland
Kryoröhrchen	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Membranfolie	HJ-Bioanalytik GmbH, Erkelenz, Deutschland
Mikrotiterplatten 96-Well	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
<i>Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Oligonukleotid Microarrays	Agilent, Waldbronn, Deutschland
<i>Procarvate Total RNA Nano Chips</i>	Agilent, Waldbronn, Deutschland
„riplate BV“ 10 ml Deep Well Platten	HJ-Bioanalytik GmbH, Erkelenz, Deutschland
RNA labeling Kit: USL Fluorescent labeling Kit für Agilent Arrays	Kreatech, Amsterdam, Niederlande
RNA Protect® Bacteria Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase-freies DNase Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Serologische Pipetten (2,5,10 und 25 ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Sterilfilter: 0.2 µm Porengröße	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
<i>4er Gasket Slide</i>	Agilent, Waldbronn, Deutschland
Zellkulturflaschen (75 cm ²) mit Belüftungskappe	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Mikrotiterplatten für die Zellkultur, unbehandelte Oberfläche	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Antibiotika

Die nicht explizit genannten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Merck, Roth, Serva oder Sigma-Aldrich in den höchstmöglichen Reinheitsgraden bezogen. Die speziell für die Experimente sowie für die zellbiologischen Experimente eingesetzten Chemikalien sind in Tabelle 3 aufgelistet. Das eingesetzte Enzym und die verwendeten Antibiotika sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller, Firmensitz
Kaliumtellurit	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Zinkchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kupferchlorid x 2H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland
Quecksilberchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zellbiologische Experimente:	
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin-EDTA 1 %	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Zur Herstellung der Tellurit- bzw. Quecksilberchlorid-Stammlösung wurden 1.269 g Kaliumtellurit bzw. 135.8 mg Quecksilberchlorid in 5 ml MilliQ-Wasser (mQH₂O) gelöst. Für die Zink- bzw Kupferchlorid-Stammlösung wurden 13.63 g Zinkchlorid bzw. 17.05 g Kupferchlorid in 100 ml mQH₂O gelöst. Die Lösungen wurden sterilfiltriert (Porengröße: 0.2 µm, Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) und lichtgeschützt bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

Tabelle 4: Eingesetztes Enzym und die verwendeten Antibiotika

Enzym/Antibiotikum	Hersteller, Firmensitz
Lysozym (Hühnereiweiß)	Fluka, Oberhaching, Deutschland
Ciprofolxacin (1mg/ml)	Fluka, Oberhaching, Deutschland
Tobramycin (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ceftazidim (10 mg/ml)	Fluka, Oberhaching, Deutschland

Von den Antibiotika wurden Stammlösungen mit der in Tabelle 4 angegebenen Konzentrationen in mQH₂O angesetzt, sterilfiltriert (Porengröße: 0.2 µm, Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland), aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Der pH-Wert der Ciprofloxacin-Lösung wurde mit 3 M NaOH auf pH 12 eingestellt.

2.1.3 Medien und Lösungen

Die verwendeten Medien sind in Tabelle 5 und die verwendeten Lösungen in Tabelle 6 aufgeführt. Die Medien für die zellbiologischen Experimente sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Die Medienkomponenten wurden, sofern nicht anders angegeben, in mQH₂O gelöst und autoklaviert bzw. sterilfiltriert (Porengröße: 0.2 µm, Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland). Bei Festmedien wurden 15 g Agar (Span-Agar, Hellmuth Caroux GmbH, Hamburg, Deutschland) pro Liter Medium vor dem Autoklavieren hinzugefügt.

Tabelle 5: Verwendeten Medien sowie ihre Zusammensetzung

Medium	Komponente	Konzentration
Artifiziellles Urinmedium		
Lösung 1	Trypton	1 g/L
	Hefeextrakt	5 mg/L
	Milchsäure	100 µl/L
	Zitronensäure	0.4 g/L
	Harnstoff	10 g/L
	Harnsäure	70 mg/L
	Kreatinin	0.8 g/L
	Natriumchlorid	5.2 g/L
	Eisen(II)sulfat x 7 H ₂ O	1.2 mg/L
	Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	0.49 g/L
	Natriumsulfat	1.4 g/L
	Ammoniumchlorid	1.3 g/L
Lösung 2	Natriumcarbonat	2.1 g/L
	Calciumchlorid x 2 H ₂ O	0.37 g/L
Lösung 3	Kaliumdihydrogenphosphat	0.95 g/L
	di-Kaliumhydrogenphosphat	1.2 g/L
LB	Natriumchlorid	10 g/L
	Trypton	10 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
1:10 verdünntes LB	LB-Fertigmedium (Sigma-Aldrich)	2.5 g/L
Minimalmedium	Glukosemonoydrat	2.5 g/L
	Eisen(II)sulfatheptahydrat	1.2 mg/L
	Calciumchloriddihydrat	85 mg/L

Tabelle 5: Fortsetzung

3,4-Dihydroxybenzoesäure	25 mg/L
Ammoniumchlorid	2.5 g/L
Magnesiumsulfatheptahydrat	0.49 g/L
Natriumsulfat	1.41 g/L
Di-Kaliumphosphat	20.6 g/L
Kaliumdihydrogenphosphat	13 g/L
gelöst in mQH ₂ O	

Das artifizielle Urinmedium (AUM) nach Brooks und Keevil entspricht in seiner Zusammensetzung dem menschlichen Urin und wurde zur Kultivierung der Bakterienstämme unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen eingesetzt (Brooks & Keevil, 1997). Die Bestandteile der einzelnen Lösungen wurden in dH₂O so gelöst, dass eine doppelt konzentrierte Lösung entstand. Der pH-Wert von Lösung 1 wurde mit 3 M Natriumhydroxid auf 6.5 eingestellt. Um den pH-Wert der Lösung 2 zu senken und das entstandene Calciumcarbonat zu lösen, wurde konzentrierte Salzsäure zugegeben. Mit 3 M Natriumhydroxid wurde der pH-Wert wieder auf 6.5 eingestellt. Von Lösung 3 erfolgte die Einstellung des pH-Wertes von 6.5 mit konzentrierter Salzsäure. Vor dem Sterilfiltrieren wurde Lösung 3 zu Lösung 1 gegeben und anschließend Lösung 2 hinzugefügt.

Tabelle 6: Verwendeten Lösungen sowie ihre Zusammensetzung

Lösung	Komponente	Konzentration
NaCl-Lösung	Natriumchlorid	0.9 % (w/v)
NaOH-Lösung	Natriumhydroxid	40 g/L
Luminol-Lösung	Luminol	0.017719 g/10 ml 1 M NaOH
Hank's Balanced Salt Solution mit 2 % (v/v)	HBSS DMSO	98 ml 2 ml
DMSO		

Tabelle 7: Verwendeten Medien und Lösungen für zellbiologische Experimente

Medium/Lösung	Hersteller, Firmensitz
Quantum 286	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Medium zur Kryokonservierung	
10 % DMSO (v/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
10 % Fötale Kälberserum (v/v)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
80 % Quantum 286 (v/v)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
MTT-Stammlösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
5 mg MTT gelöst in 1 ml PBS	
Lagerung: Lichtgeschützt bei 4 °C	

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Sterilisation

Die Sterilität der verwendeten Medien, Lösungen und benötigten Glasgeräte wurde durch Autoklavieren mit Heißdampf bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 20 min hergestellt. Hitzeempfindliche Medienzusätze und Lösungen wurden durch einen Zelluloseacetat-Filter mit einer Porengröße von 0.2 µm (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) sterilfiltriert.

2.2.2 Verwendete Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *P. aeruginosa*-Stämme sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Beschreibung der verwendeten *P. aeruginosa*-Stämme. Die von Dr. M. Hogardt zur Verfügung gestellten Stämme stammen aus der Klinik Großhadern aus München. Das Isolat von Dr. R. Neubauer stammt aus einer Privatpraxis in Kassel. MSU = Mittelstrahlurin, Isolat aus einer chronischer Infektion = (chronisch)

Stamm	Beschreibung	Referenz/Quelle
<i>P. aeruginosa</i>	Laborstamm PAO1	Holloway <i>et al.</i> , 1979
uropathogenen <i>P. aeruginosa</i> -Isolate		
MH19	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt, Tielen <i>et al.</i> , 2011

Tabelle 8: Fortsetzung

RN21	Isolat aus MSU	Dr. R. Neubauer, Tielen <i>et al.</i> , 2011
MH27	Isolat aus Katheter-Urin (chronisch)	Dr. M. Hogardt, Tielen <i>et al.</i> , 2011
MH38	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt, Tielen <i>et al.</i> , 2011

2.2.3 Kultivierungsbedingungen

Zur Kultivierung von Bakterien wurden sterile Medien, Lösungen und Gefäße verwendet. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen.

2.2.3.1 Anzucht von Übernachtskulturen

Für die Kultivierung von Übernachtskulturen wurden in Reagenzgläsern 5 ml LB mit Einzelkolonien von einer Festmedienkultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte, sofern nicht anders angegeben, aerob über Nacht (ü.N.) bei 37 °C und 200 rpm.

2.2.3.2 Kultivierung auf Festmedium

Für die Kultivierung von Bakterien auf Festmedium wurde mit einer Impföse steril Bakterienmaterial aus einer Glycerin-Gefrierkultur (- 80 °C) oder von einer bestehenden Festmedienkultur entnommen und auf Festmedium ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte, sofern nicht anders angegeben, aerob ü.N. bei 37 °C.

2.2.4 Gewinnung von Probenmaterial für die Transkriptomanalyse und ¹³C-metabolische Flussanalyse in Anwesenheit von Tellurit und Ciprofloxacin

Zur Untersuchung des Transkriptoms sowie des zentralen Kohlenstoffwechsels vom Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 wurden die Mikroorganismen in Minimalmedium (siehe Kapitel 2.1.3) kultiviert. Dabei erfolgte die Kultivierung in 24 Deep Well Platten (HJ-Bioanalytik GmbH, Erkelenz, Deutschland), welche mit einer luftdurchlässigen sowie sterilen Membranfolie (HJ-Bioanalytik GmbH, Erkelenz, Deutschland) verschlossen wurde. Standardmäßig wurde bei 37 °C und 1050 rpm im Schüttelinkubator (Heidolph Instruments

GmbH, Schwabach, Deutschland) inkubiert. Für die erste Vorkultur wurden 6 ml LB mit 30 µl der jeweiligen Kryokultur ($OD_{578\text{ nm}}$ von 2 ± 0.3) angeimpft. Anschließend wurden jeweils 1.4 ml auf die Deep Wells verteilt und für 6 bis 7 h unter Standardbedingungen inkubiert. Ausgehend von der ersten Vorkultur wurde für die zweite Vorkultur 5 bis 10 ml Minimalmedium auf eine $OD_{578\text{ nm}}$ von 0.2 angeimpft. Davon wurden jeweils 1.4 ml Kultur in die Deep Wells pipettiert und ü.N. standardmäßig inkubiert. Für die Hauptkultur wurden 12 ml Minimalmedium auf eine $OD_{578\text{ nm}}$ von 0.1 bis 0.15 mit der entsprechenden Vorkultur angeimpft. Nach der Zugabe von Ciprofloxacin und/oder Tellurit (siehe Tabelle 9) erfolgte die standardmäßige Inkubation. Innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase erfolgte die Probeentnahme. Die Kultivierung erfolgte in Zusammenarbeit mit Nancy Schäper vom Institut für Bioverfahrenstechnik der TU Braunschweig.

Tabelle 9: Verwendeten Konzentrationen von Tellurit und Ciprofloxacin

Komponente	Laborstamm <i>P. aeruginosa</i> PAO1
Ciprofloxacin	0.052 µg/ml
Ciprofloxacin und	0.046 µg/ml
Tellurit	0.005 mg/ml

2.2.5 Langzeitlagerung von Bakterien

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Bakterienstämmen wurden Glycerin-Gefrierkulturen angelegt. Hierzu wurden 700 µl einer Übernachtskultur mit 300 µl sterilem 80 % (v/v) Glycerin gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4 °C erfolgte die Lagerung bei - 80 °C.

2.2.6 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde mittels UV-VIS Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 578 nm bestimmt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass eine $OD_{578\text{ nm}}$ von 1 einer Zellzahl von $1 \cdot 10^9$ Zellen pro ml entspricht.

2.2.7 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KbE)

Für die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten wurden die Bakteriensuspensionen mittels Verdünnungsreihe dezimal von 10^0 bis $1 \cdot 10^{-8}$ in 0.9 % (w/v) NaCl verdünnt. Von den angefertigten Verdünnungen wurden jeweils 10 µl mittels Mehrkanalpipette auf eine LB- Agarplatte aufgetragen. Die Kultivierung erfolgte ü.N. bei 37 °C. Am nächsten Tag wurden die entstandenen Kolonien einer geeigneten Verdünnungsstufe ausgezählt. Unter Berücksichtigung der ausgezählten Verdünnungsstufe wurde die Anzahl der KbE/ml berechnet.

2.2.8 MIC-Bestimmung auf tellurithaltigem Agarnährmedien

Die minimale inhibitorische Konzentration (MIC) wurde als die geringste Konzentration einer Testsubstanz definiert, welche einen Hemmhof um ein Testplättchen erzeugte (Wiegand *et al.*, 2008). Auf tellurithaltigen Agarnährmedium wurden die MIC-Werte für die Antibiotika Ceftazidim, Ciprofloxacin und Tobramycin für die urophatogene *P. aeruginosa*-Isolate MH19, MH27, MH38 und RN21 sowie für den Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 bestimmt, um den Einfluss von Tellurit auf die Wirksamkeit von Antibiotika zu untersuchen. Die für die Nähragarplatten verwendeten Telluritkonzentrationen entsprachen 1/75 der zu vor bestimmten isolatspezifischen MIC-Werte (siehe Tabelle 10). Die eingesetzte Konzentration von den zu testenden Antibiotika orientierten sich an den MIC-Werten der *P. aeruginosa*-Isolate (siehe Tabelle 11). Im Anhang sind die MIC-Werte für die Antibiotika angegeben (siehe Tabelle 22). Die MIC-Werte für Tellurit sind in Tabelle 16 aufgelistet.

Die Vorkulturen der zu untersuchenden Stämme wurden ü.N. bei 37 °C und 200 rpm in LB inkubiert und im Anschluss mit LB auf eine $OD_{578 \text{ nm}}$ von 0.2 verdünnt. Je 100 µl Bakteriensuspension wurden auf Nähragarplatten (AUM, 1:10 LB) ausplattiert, wodurch ein konfluenter Bakterienrasen entstand. Testplättchen (Cellulose, Ø = 9 mm; Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) wurden auf den zuvor beimpften Agar gelegt. Je 30 µl der zu testenden Substanz wurden auf die Testplättchen pipettiert. Als Negativkontrolle diente

mQH₂O. Nach der Inkubation für 18 h ± 2 h bei 37 °C wurde der Durchmesser der Hemmhöfe um die Testplättchen gemessen und daraus die Fläche der Hemmhöfe berechnet.

Tabelle 10: Verwendeten Konzentrationen von Tellurit

<i>P. aeruginosa</i> -Isolat	AUM	1:10 LB
	Tellurit [μM]	
MH19	218.7	218.7
MH27	16	13.3
MH38	46.7	20
RN21	4	8
PAO1	13.3	12

Tabelle 11: Verwendeten Antibiotikakonzentrationen

<i>P. aeruginosa</i> -Isolat	AUM	1:10 LB
	Ceftazidim [μg/ml]	
MH19	16	13
MH27	34	25
MH38	325	325
RN21	25	26
PAO1	33	24
	Ciprofloxacin [μg/ml]	
MH19	12	10
MH27	11.7	14.3
RN21	14	16
PAO1	19	19
	Tobramycin [μg/ml]	
MH19	218.7	218.7
MH27	16	13.3
MH38	46.7	20
RN21	4	8
PAO1	13.3	12

2.2.9 MIC-Bestimmung auf Agarnährmedien

Die MIC-Werte von Kupfer, Quecksilber, Zink sowie Tellurit wurden für die uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate MH19, MH27, MH38 und RN21 sowie für den Referenzstamm *P. aeruginosa* PAO1 bestimmt. Das Experiment wurde, wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben, durchgeführt. Als Negativkontrolle diente mQH₂O. Nach der Inkubation für 18 h ± 2 h bei 37 °C wurde bestimmt, ob ein Hemmhof um das Testplättchen entstanden ist.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Verwendete Zelllinie

Die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie ist in Tabelle 12 angegeben.

Tabelle 12: Verwendete Zelllinie

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
ECV 304	Hybridom aus humaner Harnblasenkarzinom Zelllinie T24, mit endothelartigen Eigenschaften	(Takahashi <i>et al.</i> , 1990; Takahashi & Sawasaki, 1991, 1992)

Diese Zelllinie wurde in 75 cm² Zellkulturflaschen mit Belüftungsklappe in Quantum 286-Medium (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) standardmäßig bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.3.2 Passagieren der Zellen

Um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten, wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 80 bis 90 % passagiert. Dazu wurde das vorhandene Medium abgesaugt und der Zellrasen wurde anschließend mit 5 ml Trypsin-EDTA (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) abgelöst. Der Ablösungsprozess erfolgte für 2 bis 5 min im

Brutschrank unter Standardbedingungen. Sobald sich größere Teile des Zellrasens lösten, wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml Quantum 286-Medium abgestoppt. Der Flaschenboden wurde mehrmals mit der Zellsuspension gespült, um die restlichen Zellen vom Boden zu lösen. Dieser Vorgang wird als Abtrypsinieren bezeichnet. Die Zellsuspension wurde entsprechend der gewünschten Splittrate (1:2 bis 1:20) in neue Zellkulturflaschen verteilt und unter Standardbedingungen im Brutschrank bis zur Konfluenz kultiviert.

2.3.3 Kryokonservierung der Zellen

Kryostabilate wurden angelegt, um die Zellen längerfristig zu lagern und um eine gleichbleibende Qualität zu garantieren. Hierfür wurde eine konfluent bewachsene Zellkulturflasche abtrypsinisiert. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 655 rpm und RT zentrifugiert (Allegra X-12R Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, USA). Das Zellsediment wurde in Kryokonservierungsmedium (siehe Tabelle 7) resuspendiert und jeweils 1 ml Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen pipettiert. Die Kryogefäße wurden ü.N. in einem mit Isopropanol gefüllten Gefäß (Nalgene Cryo 1 °C „Freezing Container“, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei -80 °C eingefroren. Am darauf folgenden Tag konnten die Gefäße in flüssigen Stickstoff überführt werden.

2.3.4 Reanimation der kryokonservierten Zellen

Für die Reanimation der kryokonservierten Zellen wurde ein Kryoröhrchen aus flüssigem Stickstoff entnommen, auf Eis transportiert und sofort bei 37 °C im Wasserbad unter leichtem Schwenken aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in 14 ml vorgewärmten Zellkulturmedium aufgenommen. Nachdem die Zellen adhärten, wurde das DMSO-haltige Medium durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie für die Versuche verwendet oder wurden gesplittet.

2.3.5 Bestimmung der Zellzahl

Mittels einer Fuchs-Rosenthal-Kammer wurde die Anzahl der Zellen mikroskopisch bestimmt. Dafür wurden ca. 15 µl der Zellsuspension zwischen der Zählkammer und dem Deckgläschen pipettiert. Je 4 diagonal liegende Großquadrate wurden ausgezählt. Aus den erhaltenen Werten wurde der Mittelwert gebildet und mit dem Kammerfaktor sowie ggf. mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Das ermittelte Ergebnis beschreibt die Zellzahl pro ml.

2.3.6 Aussäen von Zellen

Die Zellen wurden 24 h vor Versuchsbeginn ausgesät. Hierfür wurden zwei konfluent bewachsene Zellkulturflaschen abtrypsinisiert. Die Zellsuspensionen wurden für 5 min bei RT und 1500 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Das Zellsediment wurde in 5 ml vorgewärmten Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 2.3.5). Anschließend wurde eine Zellzahl von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt. In eine Mikrotiterplatte (TPP, Trasadingen, Schweiz) wurde pro Well 100 µl Zellsuspension pipettiert. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen im Brutschrank.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 MTT-Test

Bei dem MTT-Test handelt es sich um einen *in vitro* Zytotoxizitätstest. Dieser Test basiert darauf, dass nur mitochondriale Dehydrogenasen vitaler Zellen die Reduktion von wasserlöslichen Tetrazoliumsalzen zu wasserunlöslichen Formazankristallen katalysieren (Huet *et al.*, 1992). Mit Hilfe von DMSO werden die Kristalle wieder gelöst. Die dabei entstehende bläuliche Färbung kann photometrisch quantifiziert werden.

Für den MTT-Test wurden 100 µl einer ECV304-Zellsuspension mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml pro Well in einer 96 Well-Platte ausgesät (TPP, Trasadingen, Schweiz) und für 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 2, 4 und 8 h mit unterschiedlichen Telluritkonzentrationen (Orientierung an den MIC-Werten von Tellurit) standardmäßig weiter kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und jeweils 100 µl 1:10 verdünnte MTT-Lösung pro Well auf die Zellen pipettiert. Nach einer Stunde standardmäßiger Inkubation wurde die MTT-Lösung abgesaugt und jeweils 100 µl 100 %iges DMSO pro Well auf die Zellen gegeben. Nach 16 h lichtgeschützter Inkubation bei 350 rpm und RT wurden jeweils 80 µl DMSO in eine neue 96 Well-Platte überführt und photometrisch bei einer OD von 550 nm im Mikrottestplatten-Lesegerät (Varioscan Flash, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemessen. Der Anteil der überlebenden Zellen in Prozent (Überlebensrate) wurde wie folgt bestimmt:

$$\text{Überlebensrate (\%)} = \frac{100 \% \cdot \text{OD}_{550 \text{ nm}} \text{ behandelte Zellen}}{\text{OD}_{550 \text{ nm}} \text{ unbehandelte Zellen}}$$

2.4.2 Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies

Zur Bestimmung der in Anwesenheit von Tellurit und/oder Antibiotika gebildeten Menge an ROS wurden aus einer ü.N. Vorkultur 15 ml Medium (1:10 LB) auf eine OD_{578 nm} von 0.1 beimpft und 1.5 h bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Anschließend erfolgte die Zugabe der einfachen MIC von Tellurit und/oder vom Antibiotikum (siehe Tabellen 13 und 14). Nach 1 h Inkubation bei 37 ° und 200 rpm wurden je 2 ml der Zellsuspensionen für 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert (MiniSpin, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Das Zellsediment wurde in 1 ml *Hank's Balanced Salt Solution* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), welches 2 % (v/v) DMSO (Merck, Darmstadt, Deutschland) enthielt, resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von 5 µl Luminollösung (4 mM in 1 M NaOH; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland). Die Chemilumineszenz wurde nach 10 sec im Luminometer (Biocounter M2010, Lumac, Niederlande) vermessen. Dabei betrug die Integrationszeit 10 sec. Die gemessenen relativen Lichteinheiten (RLE) entsprechen der

gebildeten Menge an ROS. Die Reaktion von Luminol mit ROS im alkalischen Milieu führt zur Bildung von 3-Aminophtalat. Dieses instabile Intermediat geht vom angeregten Zustand in den Singulett-Grundzustand über. Die bei diesem Vorgang emittierten Photonen werden mittels Luminometer detektiert.

Die gemessenen RLE wurde auf $1 \cdot 10^6$ Zellen bezogen. Dazu wurde die KbE (siehe Kapitel 2.2.6) bestimmt. Nach der Inkubationszeit wurde 1 ml Zellsuspension für 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert (MiniSpin, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Das Zellsediment wurde in 1 ml 0.9 %iger (v/w) NaCl-Lösung resuspendiert und dezimal verdünnt.

Tabelle 13: Die eingesetzten einfachen MIC-Werte von Tellurit

<i>P. aeruginosa</i> -Isolat	Telluritkonzentration [μ M]
MH19	1250
MH27	50
MH38	50
RN21	70
PAO1	100

Tabelle 14: Die eingesetzten einfachen MIC-Werte von den Antibiotika

<i>P. aeruginosa</i> -Isolat	Ciprofloxacin [μ g/ml]	Tobramycin [μ g/ml]
MH19	0.083	0.3
MH27	0.067	0.3
MH38	12	12
RN21	0.053	0.23
PAO1	0.075	0.3

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Grundlagen für die Isolierung von RNA

Alle verwendeten Lösungen und Verbrauchsmaterialien wurden zweimal autoklaviert, um mögliche RNase-Kontaminationen zu vermeiden. Die Lösungen wurden mit RNase-freiem Wasser (doppelt autoklaviertes mQH₂O) angesetzt. Hitzeempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland). Gebrauchsfertige Lösungen und Chemikalien wurden RNase-frei bezogen.

2.5.2 Zellernte für die Isolierung von RNA

Zur Isolierung von RNA wurde ein Volumen Bakteriensuspension zu zwei Volumen RNA Protect ® Bacteria Reagent (Qiagen, Hilden, Deutschland) gegeben und 30 sec intensiv gemischt. Anschließend erfolgten eine 5-minütige Inkubation bei RT und eine Zentrifugation für 10 min bei 4000 rpm (Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau, Deutschland) und 4 °C. Das Zellsediment wurde in 1 ml RNase-freiem Wasser resuspendiert und für 5 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau, Deutschland). Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellsediment bei - 20 °C gelagert.

2.5.3 RNeasy Mini Kit von Qiagen

Die Isolierung von RNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers (RNeasy Mini Handbook 2010, Qiagen, Hilden, Deutschland). Hinsichtlich des Zellaufschlusses wurden folgende Veränderungen vorgenommen. Die enzymatische Lyse erfolgte mit 3 mg Lysozym (Fluka, Steinheim, Deutschland) gelöst in 200 µl TE-Puffer (siehe Tabelle 7) für 30 min bei RT auf einem Rollinkubator (RM5, CAT M. Zipperer GmbH, Staufen, Deutschland). Es schloss sich ein mechanischer Aufschluss mit Hilfe von *Glass Beads* (Ø 70-125 µm, Kuhmichel, Ratingen, Deutschland) an. Nach Zugabe der *Glass Beads* wurde das Zellsediment für 3 min intensiv geschüttelt. Es erfolgte eine 3-minütige Zentrifugation

bei 4000 rpm und 4 °C (Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau, Deutschland). Die weiteren Schritte sowie der DNase-Verdau wurden nach Herstellerempfehlungen durchgeführt. Die Elution erfolgte zweimal mit 25 µl RNase-freiem Wasser. Die RNA wurde bei - 80 °C gelagert.

2.5.4 Quantifizierung und Qualitätskontrolle der isolierten RNA

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch (Nanodrop ND-1000, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) bestimmt. Zur Überprüfung der RNA-Qualität wurde der Bioanalyzer (2100 Expert, Agilent, Waldbronn, Deutschland) verwendet. Hierzu wurden 2 µl RNA (Konzentration zwischen 25-1000 µg/µl) 2 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Zur Analyse wurden *Prokaryote Total RNA Nano Chips* nach Angaben des Herstellers (Agilent, Waldbronn, Deutschland) verwendet. Es wurden nur Proben für die weiterführenden Experimente eingesetzt, bei denen die 16S rRNA sowie die 23S rRNA als klare Banden nach der Gelelektrophorese zu erkennen waren und die eine *RNA-Integrity-Number* (RIN) von mindestens 8.5 aufwiesen. Eine geringere Integrität weist auf eine zu starke Degradation der RNA hin.

2.5.5 Transkriptomanalyse

Zur Betrachtung des Transkriptoms von *P. aeruginosa* PAO1 unter definierten Bedingungen wurden *Gene Expression Microarrays* (Agilent, Waldbronn, Deutschland) verwendet. Mit dieser Methode ist es möglich, Expressionsveränderungen von bestimmten Genen vergleichend zwischen zwei Kultivierungsbedingungen zu identifizieren. Die in dieser Arbeit eingesetzten *Gene Expression Microarrays* besitzen spezifische Sonden, welche vom Genom des Laborstamms *P. aeruginosa* PAO1 abgeleitet wurden. Dabei wurden pro Gen 3 Sonden abgeleitet und in zwei technischen Replikaten auf den *Microarray* aufgetragen. Es wurde die transkriptionelle Antwort vom Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 auf die Anwesenheit von Ciprofloxacin sowie auf die Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit untersucht.

2.5.5.1 Präparation der Agilent Gene Expression Microarrays

Nach Empfehlung des Herstellers wurden 2 µg RNA mit dem USL Fluoreszent Labeling Kit für Agilent *Gene Expression Microarrays* von Kretech (Amsterdam, Niederlande) markiert. Hierfür wurden je 2 µl der Farbstoffe Cy3 und Cy5 verwendet. Neben drei biologischen Replika wurde jeweils ein Replikat umgekehrt markiert (*dye swap*). Im Anschluss wurden die Konzentrationen und die Farbstoffeinbauraten photometrisch bestimmt (Nanodrop ND-1000, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland). Nach erfolgreichem Markieren der RNA wurden die Proben fragmentiert. Hierfür wurden 850 ng des Cy3-markierten Ansatzes zu 850 ng des Cy5-markierten Ansatzes pipettiert. Dazu wurden 11 µl 10-fach konzentrierte *Blocking agent* (Agilent, Waldbronn, Deutschland) gegeben und dieses mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 52.8 µl aufgefüllt. Die Fragmentierungsreaktion wurde durch Zugabe von 2.2 µl 25-fach konzentrierten Fragmentierungspuffer (Agilent, Waldbronn, Deutschland) gestartet. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 60 °C (MyCyclerTM Thermal Cycler, Bio-Rad, München, Deutschland) wurde die Fragmentierung durch 55 µl 2-fach konzentrierten Hybridisierungspuffer (Agilent, Waldbronn, Deutschland) gestoppt. Die Proben wurden auf dem *Microarray* aufgetragen und für 17 h bei 65 °C und 10 rpm hybridisiert (Hybridization oven 1012, Shel Lab, Cornelius, USA). Nach erfolgter Hybridisierung wurde der *Microarray* nach Herstellerangaben gewaschen, getrocknet und unverzüglich im DNA-*Microarray Scanner* (High Resolution Microarray Scanner, Agilent, Waldbronn, Deutschland) ausgelesen.

2.5.5.2 Prozessierung der Agilent Gene Expression Microarrays

Nach der Datenerfassung wurden die Agilent *Gene Expression Microarrays* durch das Programm „R“ mit der Nutzung von „Bioconductor“ prozessiert (Gentleman *et al.*, 2004). Die Prä-Prozessierung erfolgte auf Grundlage des „marray-Package“ durch die Nutzung der „read.Agilent“-Funktion. Für die Nutzung von Agilent Microarrays wurde der Kontroll-Code adaptiert. In einer Qualitätskontrolle wurden die Arrays auf Artefakte und große

Unterschiede innerhalb der Replikate untersucht. Durch eine „Loess“-Normalisierung (Yang & Paquet, 2005) wurde die 2-Kanal-Normalisierung vorgenommen. Die Detektion von differentiell exprimierten Genen erfolgte durch das „limma-Package“ unter Nutzung von „lmFit“ für lineares Modelling, „eBayes“ für Signifikanz-Kalkulationen sowie „Top Table“ für die Extraktion der differentiell exprimierten Gene. Von allen Sonden, deren $\log_2(\text{FC}) \geq 0.8$ betrug, wurde die „Top Table“ konstruiert. Durch die Kalkulation der Median-Werte, erfolgte eine Zusammenfassung der verschiedenen Sonden für jedes Gen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Sequenzierung und Annotierung uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate

Die Katheter-assoziierte Harnwegsinfektion stellt die häufigste Form von nosokomialen Infektionen dar (Mittal *et al.*, 2009). *E. coli* ist der häufigste Verursacher von im Krankenhaus erworbenen sowie ambulant erworbenen Harnwegsinfektionen (Shigemura *et al.*, 2006). Dieser Mikroorganismus kann in 80 bis 90 % der unkomplizierten und in bis zu 20 % der komplizierten UTIs nachgewiesen werden (Moore *et al.*, 2002; Roland, 2002). Komplizierten Harnwegsinfektionen werden vor allem durch Bakterien wie *P. aeruginosa* verursacht (Roland, 2002; Shigemura *et al.*, 2006). Dabei kann *P. aeruginosa* zu 35 % bei katheterisierten Patienten mit einer komplizierten Harnwegsinfektion nachgewiesen werden (Mittal *et al.*, 2006; Shigemura *et al.*, 2006). Neben der intrinsischen Antibiotikaresistenz erschwert auch die durch die physiologische Diversität von *P. aeruginosa* vermittelte Fähigkeit zur Adaptation an unterschiedlichen Umweltbedingungen die Therapie (Van Delden & Iglewski, 1998; Obritsch *et al.*, 2005; Tielen *et al.*, 2011). In diesem Zusammenhang ist für uropathogene *P. aeruginosa*-Isolate eine physiologische Heterogenität beschrieben worden (Tielen *et al.*, 2011). Zusätzlich zeigten Tielen und Kollegen, dass zwischen dem Infektionsort und den physiologischen Eigenschaften ein Verbindung besteht (Tielen *et al.*, 2011). Im Vergleich zu Isolaten von Harnwegsinfektionen zeichneten sich Isolate von Katheter-assoziierten Harnwegsisolaten durch eine deutlich reduzierte Motilität, einer gesteigerten Produktion von Virulenzfaktoren sowie einer erhöhten Hämolysin-Aktivität aus (Tielen *et al.*, 2011). Eine physiologische Heterogenität ist auch für *P. aeruginosa*-Isolate von Patienten mit zystischer Fibrose beschrieben worden. Die Isolate unterscheiden sich bei der Produktion von Viruelnzfaktoren (Lee *et al.*, 2005b; Leone *et al.*, 2008), der Biofilmbildung (Lee *et al.*, 2005b), dem Quorum sensing (Lee *et al.*, 2005b; Leone *et al.*, 2008) und der Antibiotikasensitivität (Fothergill *et al.*, 2010; Mowat *et al.*, 2011). Letzteres konnte auch bei uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten beobachtet werden (Narten *et al.*, 2011). Durch

die Sequenzierung und Annotierung der Genome von uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten sollte überprüft werden, ob ein unterschiedliches genetisches Repertoire zur beobachteten physiologischen Heterogenität von diesen *P. aeruginosa*-Isolaten beiträgt. Dazu wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frank-Jörg Vorhölter der Universität Bielefeld die Genome der uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate MH19, MH27, MH38 und RN21 sequenziert und annotiert (Tielen *et al.*, 2014; Wibberg *et al.*, 2014). Dabei konnte gezeigt werden, dass in den Genomen von den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten Gene vorhanden sind, welche nicht in den Genomen der zur damaligen Zeit in den Datenbanken zur Verfügung stehenden Referenzstämmen identifiziert werden konnten. Hierbei handelt es sich um Komponenten des akzessorischen Genoms (Klockgether *et al.*, 2011), wobei die Gene einzeln als Singleton bezeichnet werden. Bei dem uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolat MH27 konnte im Genom der prozentual höchste Anteil an Singletons nachgewiesen werden. Das Genom vom uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolat MH19 wies den zweithöchsten prozentualen Singletongehalt auf. Im Vergleich zu diesen beiden Isolaten verfügten die uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate MH38 und RN21 über einen niedrigeren prozentualen Anteil an Singletons (siehe Tabelle 15).

Molina-Quiroz und Kollegen zeigten, dass Tellurit die Wirksamkeit von Antibiotika verbessert (Molina-Quiroz *et al.*, 2012). Für Silberionen ist ähnliches bekannt (Morones-Ramirez *et al.*, 2013). Dabei werden Silber bzw. Silberverbindungen bereits als Bestandteil von Wundauflagen und –verbänden eingesetzt oder zur Beschichtung von Blasenkathetern verwendet (Leaper, 2006; Abedini *et al.*, 2013). Damit ergeben sich aus dem Antibiotika-verstärkenden Effekt von Tellurit neue therapeutische Ansätze. In diesem Zusammenhang ist die Sensitivität der uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate gegenüber Tellurit entscheidend. Deshalb wurde in dieser Arbeit zunächst die Singletongruppe betrachtet, die mit einer Resistenz gegenüber Tellurit in Verbindung gebracht werden konnte. Um zuverlässige Aussagen über den Zusammenhang zwischen den Singletons und der Sensitivität treffen zu können, wurden ebenfalls die Singletongruppen betrachtet, die mit einer Resistenz gegenüber Kupfer, Zink und Quecksilber in Verbindung gebracht werden konnten. Die vollständige Liste dieser Singletongruppen samt Funktionsbeschreibung ist dem Anhang zu entnehmen (siehe Tabelle 23).

Tabelle 15: Genomische Eigenschaften von den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten MH19, MH27, MH38 und RN21 sowie Gene, welche mit einer Resistenz gegenüber bestimmten Schwermetallen sowie mit Tellurit in Verbindung gebracht werden können.

<i>P. aeruginosa</i> - Isolat	MH19	MH27	MH38	RN21
Genomgröße (bp)	7124061	7156051	6896886	7041058
Vorhergesagte Gene	6366	6309	6149	6422
Singletonanzahl	628	716	497	452
Prozentuale Anteil der Singletons [%]	9.86	11.35	8.08	7.04
Zusammenhang mit Schwermetallresistenz				
Arsen	2	1	0	0
Cadmium	2	1	0	0
Chromat	0	1	3	1
Czc-System (Cobalt/Zink/Cadmium)	1	0	3	3
Kupfer	8	8	9	8
Tellurit	6	8	0	0
Quecksilber	3	5	1	0
Zink	2	1	1	1
sonstige	1	1	2	1

Bei den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten MH19 und MH27 konnte eine hohe Anzahl an Singletons, die im Zusammenhang mit einer Resistenz gegenüber Schwermetallen stehen, identifiziert werden. Dagegen konnten im Genom der anderen beiden uropathogenen Isolate weniger Singletons aus dieser Gruppe identifiziert werden (siehe Tabelle 15). Bei allen uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten konnten vergleichsweise viele Singletons identifiziert werden, die mit einer Resistenz gegenüber Kupfer in Verbindung gebracht werden konnten. Des Weiteren wurden bei den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten MH19 und MH27 Singletons nachgewiesen, die in Zusammenhang mit einer Resistenz gegenüber Tellurit und Quecksilber stehen. Bei den weiteren uropathogenen Isolaten konnte von dieser Singletongruppe entweder ein oder kein Gen identifiziert werden. Zu den weiteren Schwermetallen konnte im Vergleich nur eine geringe Singletonanzahl zugeordnet werden (siehe Tabelle 15).

Bei den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten MH19 und MH27 konnte das für die Quecksilber-Reduktase kodierende Gen *merA* identifiziert werden. Dieses Enzym katalysiert die Reduktion von reaktiven zweiwertigen Quecksilberionen (Hg^{2+}) zum elementarem Quecksilber (Hg^0), welches inert und flüchtig ist (Barkay *et al.*, 2003). Im Genom dieser *P. aeruginosa*-Isolate wurde ebenfalls das Gen *merR* gefunden. Das *P. aeruginosa*-Isolat MH27 verfügt außerdem über das Gen *merT*. Im Genom des uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolats MH38 wurde ausschließlich das Gen *merD* identifiziert werden. Das Gen *merR* kodiert für den Regulator der strukturellen Gene des *mer* (*mercury resistance*) - Operons (*merTPCFAD*) (Nascimento & Chartone-Souza, 2003). Bei dem Gen *merT* handelt sich um ein membrangebundenes Protein, welches für die Aufnahme von Hg^{2+} mitverantwortlich ist (Mathema *et al.*, 2011). In der Publikation von Barkay *et al.* sowie Mathema *et al.* ist das Model eines typischen *mer*-Operons von gram-negativen Mikroorganismen detailliert beschrieben worden (Barkay *et al.*, 2003; Mathema *et al.*, 2011).

In den Genomen der uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten konnte eine unterschiedliche Anzahl an Genen, welche im Zusammenhang mit einer Resistenz gegenüber Kupfer stehen, identifiziert werden (siehe Tabelle 15). Dazu zählen u.a. die Gene *copAB*, *cueR* sowie *pcoABC*. Bei *E. coli* wurden mehrere zelluläre Resistenzsysteme zum Schutz gegenüber Kupfer gefunden (Espírito Santo *et al.*, 2008). Dazu gehört das für eine Cu^{1+} -transportierende P-Typ ATPase kodierende Gen *copA* (Fan *et al.*, 2001). CopA transportiert Cu^{1+} aus dem Cytoplasma ins Periplasma. Das Gen *copA* wird durch CueR reguliert (Grass & Rensing, 2001; Espírito Santo *et al.*, 2008). Das Gen *copA* konnte bei den uropathogenen Isolaten MH19, MH27 sowie MH38 identifiziert werden. CueR ist ein MerR-ähnlicher transkriptioneller Regulator, der durch die Bindung von Cu^{1+} aktiviert wird (Rensing & Grass, 2003; Espírito Santo *et al.*, 2008). Dieses Gen wurde bei den uropathogenen Isolaten MH19, MH27 und RN21 gefunden. Einige *E. coli*-Stämme besitzen Plasmid-kodierte Gene, welche eine Resistenz gegenüber Kupfer vermitteln. Dazu zählt das Pco-System des Plasmids pRJ1004. Dieses System umfasst die Gene *pcoABCDRE* (Lee *et al.*, 2002). Die Funktion der einzelnen Komponenten ist in der Publikation von Sato *et al.* beschrieben worden (Sato *et al.*, 2008). Das Plasmid-kodierte Cop-System von *P. syringae pathovar*

tomato bestehend aus den Genen *copABCDRS* ist homolog zum Pco-System (Teitzel *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006). Das Gen *pcoC* konnte bei allen uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten identifiziert werden. Mit Ausnahme vom uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolat MH27 verfügen die weiteren Isolate über das Gen *pcoB*. Das Gen *pcoA* wurde nur bei dem uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolat RN21 gefunden.

Bei allen uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten wurde das Gen *zitB*, welches für einen Zinktransporter kodiert, identifiziert. Bei dem *P. aeruginosa*-Isolat MH19 konnte ein weiteres für einen Zinktransporter kodierendes Gen identifiziert werden (siehe Tabelle 15). Bei *E. coli* wird die Expression von *zitB* durch Zink induziert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von ZitB zu einer erhöhten Zinkresistenz sowie einer verringerten Aufnahme von Zink führt (Grass *et al.*, 2001). Chao und Kollegen wiesen nach, dass es sich bei ZitB um einem $\text{Zn}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiporter handelt (Chao & Fu, 2004). Dabei wird dieser Transporter zur CDF (*cation diffusion facilitator*)-Familie gezählt (Chao *et al.*, 2004).

Bei den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten MH19 und MH27 konnten die Gene *terA*, *terB*, *terC*, *terD* und *terZ*, welche zum *ter*-Operon gehören, identifiziert werden. Zusätzlich konnte bei dem Isolat MH27 das Gen *terE* gefunden werden. Das *ter*-Operon ist eines der fünf charakterisierten Telluritresistenzdeterminaten bei gram-negativen Mikroorganismen. Bezüglich der Funktion dieser Resistenzdetermine ist wenig bekannt (Zannoni *et al.*, 2008). Die bisherigen Erkenntnisse sind im Kapitel 1.6 zusammengefasst.

Mit der Identifikation von Singletons in den Genomen der uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate MH19, MH27, MH38 und RN21 ist die Frage nach deren Herkunft verbunden. In diesem Zusammenhang sind Plasmide, welche Resistenzen gegenüber Schwermetalle vermitteln, beschrieben worden (Stepanuskas *et al.*, 2006; Chasteen *et al.*, 2009; Calderón *et al.*, 2013). Dabei liegen beispielsweise vier Telluritresistenzdeterminaten auf Plasmiden kodiert vor (Chasteen *et al.*, 2009). Außerdem wurde das bereits beschriebene *mer*-Operon häufig auf konjugativen Plasmiden identifiziert (Calderón *et al.*, 2013). Damit scheint, ähnliche wie bei Antibiotikaresistenzen, der horizontale Gentransfer eine Möglichkeit zur Verbreitung von Resistenzen gegenüber Schwermetallen zu sein. Dabei setzt diese Variante der Resistenzverbreitung einen Kontakt zwischen Donor und Rezipient voraus. Da *E. coli*,

ähnlich wie *P. aeruginosa*, ein häufiger Verursacher von UTIs ist (Moore *et al.*, 2002; Roland, 2002), könnte z.B. das Vorhandensein von Gene des Pco-Systems in den Genomen uropathogener *P. aeruginosa*-Isolate auf horizontale Gentransfers während einer UTI basieren. Das Vorhandensein von Resistenzdeterminaten auf Plasmiden würde auch die beobachtete variable Singletonverbreitung innerhalb der Genome uropathogene *P. aeruginosa*-Isolate erklären. Zur Verbreitung von Resistenzen gegenüber Schwermetallen bei uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Häufig liegen Gene, welche für Metall- und Antibiotikaresistenzen kodieren, auf einem Plasmid vor (Summers, 2002). Damit würde das Vorhandensein von Antibiotika zur Selektion von Bakterien, die resistent gegenüber Schwermetallen sind, beitragen (Baker-Austin *et al.*, 2006; Deredijan *et al.*, 2011; Calderón *et al.*, 2013). Die Verbreitung und letztlich das Vorhandensein von Singletons in den Genomen uropathogener *P. aeruginosa*-Isolate würde demnach auf dem horizontalen Gentransfer bei gleichzeitiger natürlicher Selektion basieren.

Um zu überprüfen, wie empfindlich die uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate auf Tellurit und weitere Schwermetalle reagieren, wurden die MIC-Werte bestimmt (siehe Kapitel 2.2.9). Dabei indiziert der MIC-Wert die Sensitivität der uropathogenen Isolate und des Referenzstammes *P. aeruginosa* PAO1 gegenüber den getesteten Verbindungen. Außerdem sollte durch die Bestimmung der MIC-Werte überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen den Singletons und der Sensitivität gegenüber den getesteten Schwermetallen besteht. Da Tellurit in artifiziellem Urinmedium präzipitiert wurden die MIC-Werte in 1:10 LB bestimmt. Dabei sind die Wachstumsraten von *P. aeruginosa* in 1:10 LB mit denen in artifiziellem Urinmedium vergleichbar (N. Rosin, 2010). Die MIC-Werte für die einzelnen Schwermetalle von den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten und dem Referenzstamm *P. aeruginosa* PAO1 sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Sensitivität von den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten MH19, MH27, MH38 und RN21 sowie von dem Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 gegenüber bestimmten Schwermetallen und Tellurit. Die MIC-Werte wurden nach einer 18-stündigen Kultivierung bei 37 °C unter aeroben Bedingungen bestimmt. Es wurde 1:10 LB verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit den Standardabweichungen.

<i>P. aeruginosa</i> - Isolat	Kupfer [mM]	Quecksilber [µM]	Zink [mM]	Tellurit [mM]
MH19	11.67 ± 0.58	20.00 ± 1.00	14.00 ± 1.00	>16.40 ± 0.00
MH27	4.00 ± 0.00	7.33 ± 0.58	14.00 ± 2.00	1.00 ± 0.00
MH38	10.67 ± 1.15	10.33 ± 0.58	16.70 ± 2.10	1.50 ± 0.10
RN21	10.00 ± 1.00	10.33 ± 0.58	20.00 ± 2.60	0.60 ± 0.10
PAO1	4.00 ± 0.00	10.33 ± 0.58	18.00 ± 1.00	0.90 ± 0.06

Das uropathogene *P. aeruginosa*-Isolat MH19 wies die höchste Sensitivität gegenüber Kupfer und Quecksilber auf. Bei diesem Isolat konnte die niedrigste Sensitivität gegenüber Zink beobachtet werden. Das uropathogene *P. aeruginosa*-Isolat MH27 reagierte besonders sensitiv auf diese drei getesteten Schwermetalle. Die Sensitivität gegenüber diesen Schwermetallen lag bei dem uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolat MH38 im mittleren Bereich. Das uropathogene *P. aeruginosa*-Isolat RN21 wies die höchste Sensitivität gegenüber Zink auf. Die Sensitivität gegenüber Kupfer und Quecksilber lag bei diesem Isolat im mittleren Bereich. Der Referenzstamm *P. aeruginosa* PAO1 reagierte am sensitivsten auf Kupfer. Bezüglich Quecksilber und Zink lag die Sensitivität des Referenzstammes im mittleren Bereich. Die uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate zeigten bezogen auf diese drei Schwermetalle ein heterogenes Verhalten. Ein deutlicher Unterschied zwischen den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten und dem Referenzstamm *P. aeruginosa* PAO1 konnte nicht beobachtet werden. Lediglich bei Kupfer und Quecksilber wiesen im Vergleich zum Referenzstamm einzelne uropathogene *P. aeruginosa*-Isolate eine verringerte Sensitivität auf. Das uropathogene *P. aeruginosa*-Isolat MH19 wies im Vergleich zu den anderen uropathogenen Isolaten und dem Referenzstamm eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber Tellurit auf. Die uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate MH27, MH38 und RN21 sowie der Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 reagierten ähnlich sensitiv gegenüber Tellurit.

Die in dieser Arbeit ermittelten Werte lagen im Bereich von den in weiteren Studien bestimmten MIC-Werten. Bei 45 *Pseudomonas* ssp., die aus mit Abwässern behandelten Erdböden isoliert wurden, betrugen die maximalen MIC-Werte für Kupfer und Zink 1600 µg/ml (9.39 mM und 11.74 mM) sowie für Quecksilber 200 µg/ml (0.74 mM) (Malik & Jaiswal, 2000). Die Untersuchung von 144 *Pseudomonas* ssp. zeigte, dass die aus mit Grundwasser behandelten Erdböden stammenden Umweltisolate für Kupfer und Zink einen maximalen MIC-Wert von 1600 µg/ml (9.39 mM und 11.74 mM) sowie für Quecksilber einen maximale MIC-Werte von 25 µg/ml (0.092 mM) besaßen. Bei den Umweltisolaten, die aus mit Abwässern behandelten Erdböden stammten, betrug der MIC-Wert für Kupfer 3200 µg/ml (18.77 mM), für Zink 2400 µg/ml (17.61 mM) und für Quecksilber 200 µg/ml (0.74 mM) (Malik & Aleem, 2011). Eine Untersuchung von 130 *P. aeruginosa*-Isolaten aus der Umwelt und dem Krankenhaus zeigte, dass die Isolate aus beiden Gruppen bis zu einer Konzentration von 20 mM Zink und 10 µM Quecksilber wuchsen. Die Umweltisolate wuchsen bis zu einer Kupferkonzentration von 0.5 mM. Dagegen konnte bei den klinischen *P. aeruginosa*-Isolaten ein Wachstum bis zu 2 mM Kupfer beobachtet werden (Deredjian *et al.*, 2011). Darüber hinaus wurde bei *E. coli* ein MIC-Wert für Kupfer von 3 mM und bei *Pseudomonas syringae* von 8 mM ermittelt (Orell *et al.*, 2010). Der MIC-Wert für Zink liegt bei *Pseudomonas putida* bei 0.63 mM (Leedjäv *et al.*, 2008). Bei dem uropathogenen *E. coli*-Isolat KL53 wurde ein MIC-Wert von 4.5 mM für Tellurit bestimmt (Valkovicova *et al.*, 2011). Der MIC-Wert des als resistent gegenüber Tellurit und verschiedenen Salzen von Schwermetallen eingestuften Umweltisolats *Staphylococcus epidermidis* CH beträgt 0.5 mM (Calderón *et al.*, 2006). Für *Pseudomonas stutzeri* KC und CTM1 ist für Tellurit ein MIC-Wert von 0.1 bzw. 0.0075 mM beschrieben worden (Zawadzka *et al.*, 2006). Bei 48 *Pseudomonas* ssp., welche aus Abwässern eines Krankenhauses isoliert wurden, betrugen der höchste MIC-Wert 85 µg/ml (0.34 mM) (Coral *et al.*, 2006). Bei klinischen enterohämorrhagischen *E. coli* 0157:H7-Isolaten lagen die MIC-Werte zwischen 32 und 1024 µg/ml (0.13 und 4.04 mM) (Bielaszewska *et al.*, 2005). Verglichen mit diesen MIC-Werten scheinen die uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate unter den gegebenen Bedingungen weniger sensitiv gegenüber den getesteten Schwermetallen zu sein.

In dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen den Singletons und Sensitivität gegenüber den vier getesteten Verbindungen beobachtet werden. Bei den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten MH19 und MH27 konnten Komponenten des *ter*-Operons nachgewiesen werden. Allerdings unterschieden sie sich deutlich in der Höhe des MIC-Wertes. Ähnliches konnte bei Quecksilber, Kupfer und Zink beobachtet werden. Bei dem uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolat RN21 konnte keine Singletons identifiziert werden, die in einem Zusammenhang mit einer Resistenz gegenüber Quecksilber stehen. Dennoch war der MIC-Wert höher als der des uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolats MH27, bei dem fünf Quecksilberresistenz-assoziierte Singletons nachgewiesen werden konnten. Bei den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolat MH27, MH38 und RN21 konnten acht Singletons, die mit einer Resistenz gegenüber Kupfer stehen, identifiziert werden. Allerdings wies das Isolat MH27 im Vergleich einen deutlich niedrigeren MIC-Wert auf.

Die Resistenz gegenüber Schwermetallen basiert auf strukturell und funktionell ähnlichen Mechanismen wie die Antibiotikaresistenz (Baker-Austin *et al.*, 2006). Zu diesen Mechanismen gehören u.a. eine reduzierte Permeabilität, die Effluxsysteme, die Modifikation zellulärer Zielstrukturen und die Inaktivierung durch Modifikation (Baker-Austin *et al.*, 2006). Bei dem uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolat MH19 konnte beispielsweise während der Kultivierung mit Tellurit eine Schwarzfärbung beobachtet werden. Diese Verfärbung basiert auf der Reduktion von Tellurit zu schwarzem Tellur, welcher in der Cytoplasmamembran eingelagert wird (Chien *et al.*, 2011). Dabei wurde die Reduktion von Tellurit zum weniger toxischen Tellur als ein wesentlicher Mechanismus bei der Resistenz gegenüber Tellurit beschrieben (Chasteen *et al.*, 2009). Dies könnte die beobachtete verringerte Sensitivität des Isolats gegenüber Tellurit erklären. Da kein Zusammenhang zwischen den Singletons und der Sensitivität beobachtet werden konnte, müssen andere Mechanismen die Sensitivität gegenüber Quecksilber, Kupfer, Zink und Tellurit bei den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten bestimmen. Dabei könnten die bereits oben erwähnten Mechanismen entscheidend bei der Resistenz gegenüber Schwermetallen sein.

3.2 Tellurit verstärkt die Wirkung von Antibiotika

P. aeruginosa ist einer der häufigsten gram-negativen Erreger nosokomialer Infektionen (Obritsch *et al.*, 2005). In 11.0 bis 13.8 % der Fälle wird dieser Mikroorganismus als ursächlicher Erreger identifiziert. Auf Intensivstationen beträgt der Anteil sogar 13.2 bis 22.6 % (Driscoll *et al.*, 2007). Dieses Bakterium ist gegenüber einem breiten Spektrum an Antibiotika resistent und entwickelt während einer Antibiotikatherapie schnell neue Resistenzen (Van Delden & Iglewski, 1998; Obritsch *et al.*, 2005). Diese Faktoren erschweren die Behandlung von *P. aeruginosa*-bedingten Infektionen. Eine weitere Komplikation bei der Therapie tritt durch das Biofilmwachstum des Bakteriums auf. Die Zellen eines Biofilms weisen im Vergleich zu planktonischen Zellen eine erhöhte Resistenz gegenüber Antibiotika auf (Mah & O'Toole, 2001; Davies, 2003, Narten *et al.*, 2012). Allgemein stellt die Multiresistenz von klinisch relevanten Bakterien ein Gesundheitsproblem dar, das neue therapeutische Strategien erfordert. Ein neuer Ansatz besteht in der Kombination von Antibiotika und Tellurit (Molina-Quiroz *et al.*, 2012). Daher wurde der Einfluss von Tellurit auf die Wirksamkeit der Antibiotika Ceftazidim, Ciprofloxacin und Tobramycin auf *P. aeruginosa* untersucht. Dazu wurden uropathogene *P. aeruginosa*-Isolate auf tellurithaltigen Nähragarplatten ausgestrichen. Anschließend wurden die Isolate mit verschiedenen Konzentrationen der zu testenden Antibiotika behandelt (siehe Kapitel 2.2.8). Nach der Inkubationszeit wurde der Durchmesser der Hemmhöfe bestimmt und daraus die Fläche ermittelt. Die Fläche der Hemmhöfe indiziert die Sensitivität der Isolate gegenüber den Antibiotika und damit die Wirksamkeit der Antibiotika gegen *P. aeruginosa*.

Die Abbildungen 4, 5 und 6 zeigen den Einfluss subletaler Telluritkonzentrationen auf die Wirksamkeit von Ceftazidim, Ciprofloxacin und Tobramycin. In Tabelle 17 ist die prozentuale Zunahme der Hemmhofgröße in Abhängigkeit von subletalen Telluritkonzentrationen angegeben. Das uropathogene *P. aeruginosa*-Isolat MH38 verhielt sich im Vergleich zu den anderen Isolaten abweichend gegenüber den verwendeten Antibiotika. Deshalb werden die Ergebnisse separat dargestellt.

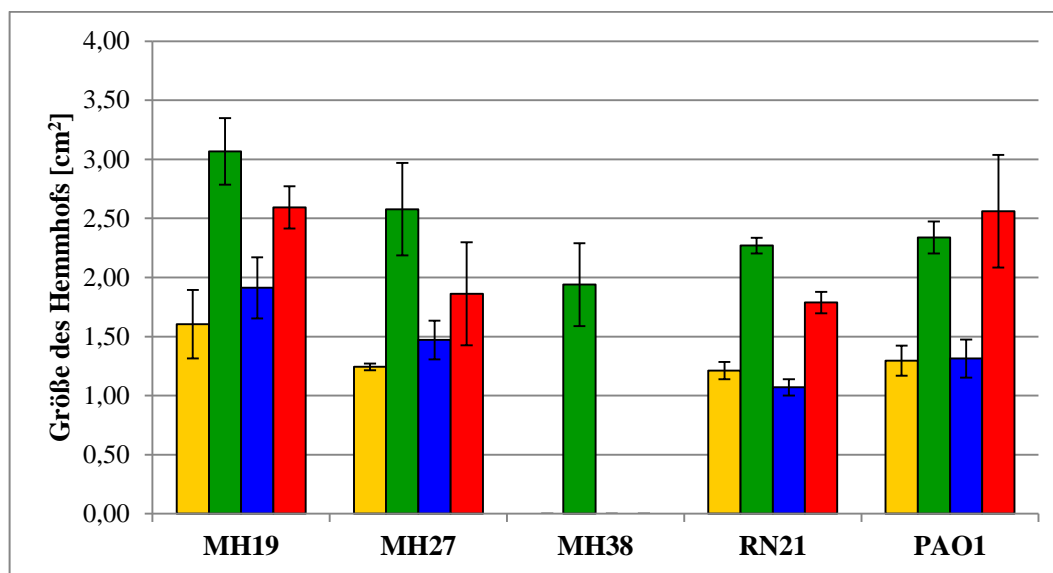


Abbildung 4: Einfluss von Tellurit auf die Sensitivität von den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten MH19, MH27, MH38 und RN21 sowie von dem Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 gegenüber Ceftazidim. Die Stämme wurden auf 1:10 LB- bzw. AUM-Agarplatten in Ab- und Anwesenheit von subletalen Telluritkonzentrationen (siehe Tabelle 10) ausgestrichen. Die jeweils verwendete Ceftazidimkonzentration orientierte sich an den MIC-Werten (siehe Tabelle 11). Die Platten wurden für 18 h bei 37 °C aerob inkubiert. Gelb: AUM-Agarplatten ohne Tellurit, grün: AUM-Agarplatten mit Tellurit, blau: 1:10 LB-Agarplatten ohne Tellurit, rot: 1:10 LB-Agarplatten mit Tellurit. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit den Standardabweichungen.

Bei Verwendung von Ceftazidim waren die Hemmhöfe der uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate und des Laborstammes *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Tellurit größer als in dessen Abwesenheit. Bei den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten nahm die Hemmhofgröße auf tellurithaltigen AUM-Agar stärker zu als auf tellurithaltigen 1:10 LB-Agar. Die *P. aeruginosa*-Isolate schienen auf AUM-Agar sensitiver auf die Kombination aus Tellurit und Ceftazidim zu reagieren als auf 1:10 LB-Agar. Dagegen reagierte der Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 auf 1:10 LB-Agar sensitiver auf die Kombination aus Tellurit und dem Antibiotikum. Bei den getesteten Stämmen konnte ein heterogenes Verhalten gegenüber der Kombination aus Tellurit und Ceftazidim beobachtet werden. Auf AUM-Agar reagierte das *P. aeruginosa*-Isolat MH27 am sensitivsten auf die Kombination aus Tellurit und Ceftazidim. Der Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 zeigte die geringste Sensitivität. Auf 1:10 LB-Agar verhielten sich das Isolat *P. aeruginosa* MH27 und der Laborstamm PAO1 genau umgekehrt. Bezüglich der Sensitivität gegenüber der

Kombination aus Tellurit und Ceftazidim lagen die Isolate *P. aeruginosa* MH19 und RN21 sowohl auf AUM-Agar als auch auf 1:10 LB-Agar im mittleren Bereich. Bei dem uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolat MH38 wurden Ceftazidimkonzentrationen bis 650 µg/µl getestet. Es konnte bei keiner getesteten Konzentration eine Beeinflussung des Wachstums beobachtet werden. Dieses Isolat scheint resistent gegenüber Ceftazidim zu sein.

Um zu überprüfen, ob Tellurit bei diesem Isolat einen Einfluss auf die Wirkung des Antibiotikums besitzt, wurde das Wachstum bei unterschiedlichen Konzentrationen des Antibiotikums in An- und Abwesenheit von Tellurit untersucht. Auf AUM-Agar konnten in Anwesenheit von Tellurit Hemmhöfe bei den getesteten Ceftazidimkonzentrationen beobachtet werden. Das Ergebnis für die mittlere Konzentration des Antibiotikums ist in Abbildung 4 dargestellt. Auf 1:10 LB-Agar konnte hingegen keine Hemmhöfe in Anwesenheit von Tellurit beobachtet werden. Somit reagiert das *P. aeruginosa*-Isolat MH38 erst in Anwesenheit von Tellurit sensitiv auf das getestete Antibiotikum.

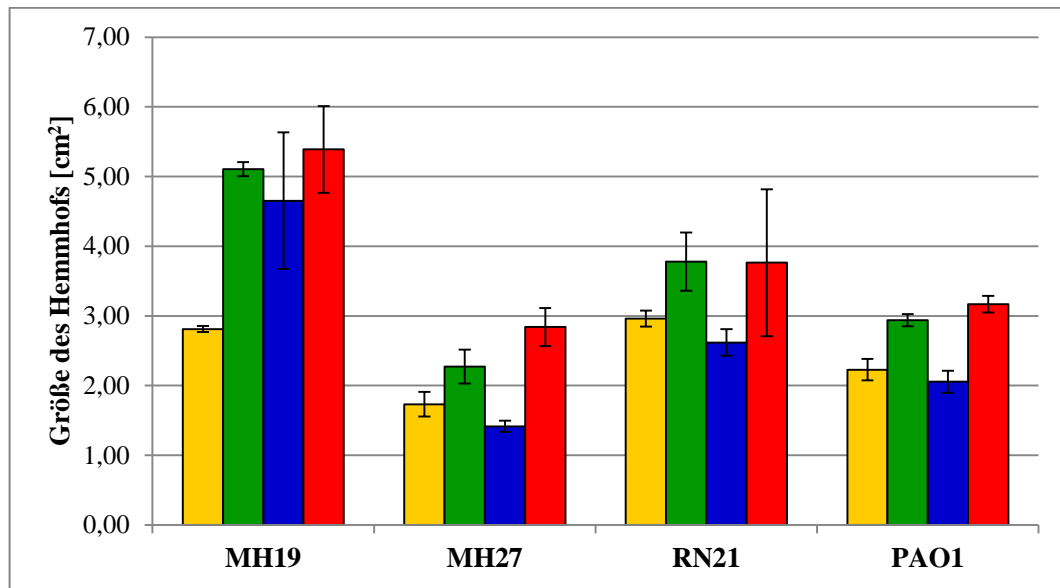


Abbildung 5: Einfluss von Tellurit auf die Sensitivität von den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten MH19, MH27 und RN21 sowie von dem Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 gegenüber Ciprofloxacin. Die Stämme wurden auf 1:10 LB- bzw. AUM-Agarplatten in Ab- und Anwesenheit von subletalen Telluritkonzentrationen (siehe Tabelle 10) ausgestrichen. Die jeweils verwendete Ciprofloxacinkonzentration orientierte sich an den MIC-Werten (siehe Tabelle 11). Die Platten wurden für 18 h bei 37 °C aerob inkubiert. Gelb: AUM-Agarplatten ohne Tellurit, grün: AUM-Agarplatten mit Tellurit, blau: 1:10 LB-Agarplatten ohne Tellurit, rot: 1:10 LB-Agarplatten mit Tellurit. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit den Standardabweichungen.

Bei Verwendung von Ciprofloxacin konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die Hemmhöfe der uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate und des Laborstammes *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Tellurit größer waren als in dessen Abwesenheit. Mit Ausnahme des klinischen Harnwegsisolats *P. aeruginosa* MH19 nahm die Hemmhofgröße auf tellurithaltigen 1:10 LB-Agar stärker zu als auf tellurithaltigen AUM-Agar. Auf 1:10 LB-Agar schienen die getesteten Stämme sensitiver auf die Kombination aus Tellurit und Ciprofloxacin zu reagieren. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die getesteten Stämme unterschiedlich auf diese Kombination reagierten. Auf AUM-Agar reagierte das Isolat *P. aeruginosa* MH19 am sensitivsten auf die Kombination aus Tellurit und Ciprofloxacin. Die Isolate *P. aeruginosa* MH27 und RN21 sowie der Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 zeigten eine vergleichbare Sensitivität gegenüber dieser Kombination. Auf 1:10 LB-Agar reagierte das Isolat *P. aeruginosa* MH27 am sensitivsten auf die Kombination aus Tellurit und Ciprofloxacin. Bei dem Isolat *P. aeruginosa* MH19 konnte die geringste Sensitivität beobachtet werden.

Bei dem uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolat MH38 konnten bei Ciprofloxacin-konzentrationen unter 60 µg/ml keine Hemmhöfe beobachtet werden. Dieses Isolat schien resistent gegenüber Ciprofloxacin zu sein.

Um zu überprüfen, ob Tellurit bei diesem Isolat die Wirksamkeit des Antibiotikums beeinflusst, wurde das Wachstumsverhalten in An- und Abwesenheit von Tellurit untersucht. Weder auf AUM- noch auf 1:10 LB-Agar konnten Hemmhöfe in Gegenwart von subletalen Telluritkonzentrationen beobachtet werden. Allerdings konnten nur Ciprofloxacin-konzentrationen bis 60 µg/ml getestet werden, da dieses Antibiotikum ab höheren Konzentrationen anfängt zu kristallisieren und somit nicht mehr für biologische Prozesse zur Verfügung steht (Halling-Sørensen *et al.*, 2000).

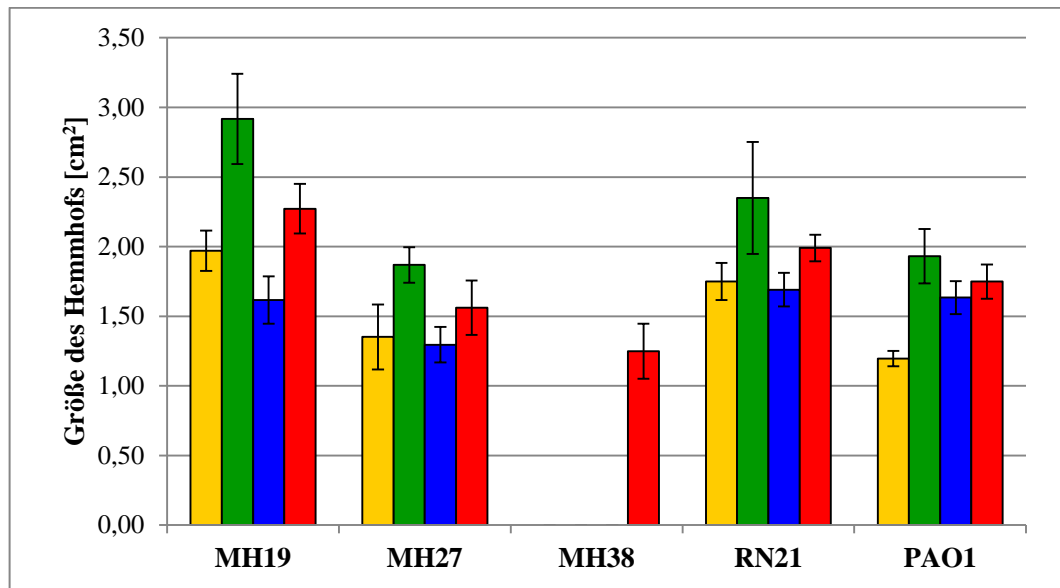


Abbildung 6: Einfluss von Tellurit auf die Sensitivität von den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten MH19, MH27, MH38 und RN21 sowie von dem Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 gegenüber Tobramycin. Die Stämme wurden auf 1:10 LB- bzw. AUM-Agarplatten in Ab- und Anwesenheit von subletalen Telluritkonzentrationen (siehe Tabelle 10) ausgestrichen. Die jeweils verwendete Tobramycinkonzentration orientierte sich an den MIC-Werten (siehe Tabelle 11). Die Platten wurden für 18 h bei 37 °C aerob inkubiert. Gelb: AUM-Agarplatten ohne Tellurit, grün: AUM-Agarplatten mit Tellurit, blau: 1:10 LB-Agarplatten ohne Tellurit, rot: 1:10 LB-Agarplatten mit Tellurit. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit den Standardabweichungen.

Bei Verwendung von Tobramycin waren die Hemmhöfe der uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate und des Laborstammes *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Tellurit größer als in dessen Abwesenheit. Ähnlich wie bei der Kombination aus Tellurit und Ceftazidim konnte beobachtet werden, dass die uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate und der Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 auf AUM-Agar sensibler auf die Kombination aus Tellurit und Antibiotikum reagierten als auf 1:10 LB-Agar. Auf AUM-Agar reagierte der Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1, gefolgt vom Isolat *P. aeruginosa* MH19, am sensitivsten auf diese Kombination. Die Isolate *P. aeruginosa* MH27 und RN21 zeigten die geringste Sensitivität gegenüber der Kombination aus Tellurit und Tobramycin.

Bei dem uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolat MH38 wurden Tobramycinkonzentrationen bis 1000 µg/ml getestet. Es konnte keine Beeinflussung des Wachstums festgestellt werden. Dieses Isolat scheint somit gegenüber Tobramycin resistent zu sein.

Um zu überprüfen, ob Tellurit bei diesem Isolat einen Einfluss auf die Wirksamkeit von Tobramycin besitzt, wurde das Wachstum in Gegenwart von Tellurit bei unterschiedlichen Konzentrationen des Antibiotikums untersucht. Auf AUM-Agar konnte erst bei hohen Tobramycinkonzentrationen eine leichte Einschränkung des Wachstums beobachtet werden. Auf 1:10 LB-Agar verursachte eine mittlere Konzentration des Antibiotikums Hemmhöfe. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 6 dargestellt. Das Isolat *P. aeruginosa* MH38 reagierte erst in Anwesenheit von Tellurit sensitiv auf Tobramycin. Ähnliches konnte bei dem Antibiotikum Ceftazidim beobachtet werden.

Tabelle 17: Die Tellurit-vermittelte Steigerung der Antibiotikawirksamkeit bei den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten MH19, MH27, MH38 und RN21 sowie bei dem Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1. Ausgehend von der Fläche des Hemmhofes in Abwesenheit von Tellurit wurde die prozentuale Zunahme der Fläche des Hemmhofes in Anwesenheit von Tellurit berechnet (Steigerungsrate). Die mittlere Steigerungsrate drückt die durchschnittliche Zunahme der Hemmhofgröße aller getesteten Stämme unter den gegebenen Bedingungen aus.

<i>P. aeruginosa</i> - Isolat	AUM	1:10 LB		
	Steigerungsrate [%] Ceftazidim	Mittlere Steigerungsrate [%]		Mittlere Steigerungsrate [%]
MH19	91.88		35.60	
MH27	108.06		26.53	
RN21	87.60		67.29	
PAO1	80.00	91.89	95.42	56.21
	Steigerungsrate [%] Ciprofloxacin			
MH19	81.85		15.91	
MH27	31.21		101.42	
RN21	27.70		43.51	
PAO1	31.84	43.15	54.63	53.87
	Steigerungsrate [%] Tobramycin			
MH19	48.22		40.12	
MH27	38.52		20.00	
RN21	34.29		17.75	
PAO1	60.83	45.47	7.36	21.31

Im Durchschnitt führte die Kombination aus Tellurit und Ceftazidim bei den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten und dem Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 in beiden Medien zur stärksten Zunahme der Hemmhofgröße. Die Kombination aus Tellurit und Tobramycin bewirkte in 1:10 LB-Medium eine durchschnittliche Zunahme der Hemmhofgröße von 21.31 %. Dies entsprach der geringsten Zunahme der Hemmhofgröße. In Anwesenheit von Tellurit und Ciprofloxacin bzw. Tobramycin nahm die Größe der Hemmhöfe in AUM im Durchschnitt um rund 40 % zu. Die beobachtete Steigerung lag im mittleren Bereich.

Die generell beobachtete Zunahme der Hemmhofgröße ist ein Indiz für eine Tellurit-vermittelte Steigerung der Wirksamkeit der getesteten Antibiotika. Molina-Quiroz und Kollegen konnten ebenfalls beobachten, dass subletale Telluritkonzentrationen bei *E. coli*, *P. aeruginosa* und *S. aureus* die Wirksamkeit von Beta-Laktam-Antibiotika wie Ampicillin und Cefotaxim sowie von Translationshemmern wie Tetracyclin und Chloramphenicol erhöhen (Molina-Quiroz *et al.*, 2012). Bei uropathogenen *E. coli*-Isolaten konnte der Antibiotika-verstärkende Effekt von Tellurit ebenfalls nachgewiesen werden (Molina-Quiroz *et al.*, 2012). Ein vergleichbarer Effekt ist für Substanzen beschrieben worden, die zur Gruppe der antibiotischen Adjuvantien gehören (Bernal *et al.*, 2013). Clavulansäure, Tazobactam und Sulbactam inhibieren Beta-Laktamasen, wodurch Beta-Laktam-Antibiotika wirksamer werden (Bernal *et al.*, 2013). Die Kombination aus Amoxicillin und Clavulansäure ermöglicht selbst eine Behandlung von Pathogenen mit diesem Antibiotikum, die Resistenzen gegenüber Beta-Laktam Antibiotika entwickelt haben (Worthington & Melander, 2013). Sanchez und Kollegen zeigten, dass die von D-Aminosäuren induzierte Dispersion des Biofilms die Wirksamkeit von Ciprofloxacin, Imipenem und Ceftazidim bei *P. aeruginosa* steigert (Sanchez *et al.*, 2014). Weitere Substanzen vermitteln einen Antibiotika-verstärkenden Effekt, indem sie die Aufnahme von Antibiotika fördern oder deren Transport aus bakteriellen Zellen via Effluxpumpen verhindern (Gordon *et al.*, 2010a; Pieren & Tigges, 2012). Somit ist das Wirkungsprinzip von Tellurit mit dem der antibiotischen Adjuvantien vergleichbar. Folglich lässt sich Tellurit dieser Gruppe von Verbindungen zuordnen (Bernal *et al.*, 2013).

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate und der Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 unterschiedlich sensitiv auf die Antibiotika bei

Telluritzugabe reagierten. In der Studie von Molina-Quiroz und Kollegen war der Antibiotika-verstärkende Effekt von Tellurit bei *S. aureus* im Vergleich zu *P. aeruginosa* und *E. coli* weniger stark ausgeprägt. Es wurde vermutet, dass die von *S. aureus* erhöhte Resistenz gegenüber Antibiotika und Tellurit ursächlich dafür sei (Molina-Quiroz *et al.*, 2012). Es konnte gezeigt werden, dass die uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate über ein unterschiedliches Antibiotika-Resistenzprofil verfügen (Narten *et al.*, 2012). Die klinischen Isolate *P. aeruginosa* MH27 und MH38 waren gegen 19 der insgesamt 23 getesteten Antibiotika resistent. Dagegen wiesen die Isolate *P. aeruginosa* MH19 und RN21 eine Resistenz gegenüber 9 bzw. 12 Antibiotika auf (Narten *et al.*, 2012). Des Weiteren konnte eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber Tellurit bei den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten festgestellt werden (siehe Tabelle 16). In dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen dem Antibiotika- sowie Tellurit-Resistenzprofil und dem Grad des Antibiotika-verstärkenden Effekts von Tellurit beobachtet werden. Bei dem von Narten und Kollegen als multiresistent eingestuftem Isolat *P. aeruginosa* MH38 wirkten die Antibiotika Ceftazidim und Tobramycin erst unter Telluritzugabe. Damit scheint das Antibiotika- und Tellurit-Resistenzprofil nicht ursächlich für die beobachtete isolatspezifische Reaktion gegenüber der Kombination aus Tellurit und Antibiotikum zu sein. Bei einer separaten Betrachtung des Antibiotika- bzw. Tellurit-Resistenzprofils wird die Wechselwirkung zwischen Schwermetallen und Antibiotika nicht berücksichtigt. Bei *P. aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass subletale Zinkkonzentrationen eine Resistenz gegenüber dem Beta-Laktam-Antibiotikum Imipenem induzieren. Zink aktiviert die Transkription des Zweikomponenten-Systems *czcRS*, was wiederum zu einer CzcR-vermittelten negativen Regulation des Gens *oprD* führt. Dieses Gen kodiert für ein Porin, welches verantwortlich für die Aufnahme von Imipenem ist (Perron *et al.*, 2005). Das Schwermetall Kupfer wirkt nach einem ähnlichen Prinzip. Kupfer induziert die Expression des Zweikomponenten-Systems *copRS*. CopR führt ebenfalls zu einer reduzierten Expression des Gens *oprD* (Caille *et al.*, 2007). Morones-Ramirez und Kollegen zeigten, dass Silberionen die Wirksamkeit eines breiten Spektrums an Antibiotika verstärkt (Morones-Ramirez *et al.*, 2013). Die Ursache für die antimikrobielle Wirkung von Silberionen ist nicht vollständig geklärt (Rai *et al.*, 2009). Park und Kollegen wiesen nach, dass Silberionen die Entstehung

von reaktiven Sauerstoffspezies induzieren. Sie vermuteten, dass eine Inhibition von Enzymen der Atmungskette vermittelt durch die Interaktion von deren Thiolgruppen mit Silberionen die Ursache dafür sei (Park *et al.*, 2009). Darüber hinaus ist beschrieben, dass Silberionen eine Alteration der DNA-Struktur verursachen, wodurch die Replikation blockiert wird (Feng *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Silberionen die Membranpermeabilität erhöhen (Morones-Ramirez *et al.*, 2013). Es wird angenommen, dass die Toxizität von Silberionen auf dessen Reaktion mit den in Proteinen bzw. in der DNA vorkommenden Amino-, Imidazol-, Phosphat-, Carboxyl- und Thiolgruppen basiert, wobei die Interaktion mit den Thiolgruppen entscheidend für die antimikrobielle Wirkung ist (Gordon *et al.*, 2010b). Demnach wäre ein sich aus der Interaktion zwischen Silberionen und Antibiotika ergebender synergistischer Effekt die Ursache für die beobachtete verbesserte Wirksamkeit von Antibiotika in Anwesenheit von Silberionen (Morones-Ramirez *et al.*, 2013). Dabei könnte dem Antibiotika-verstärkenden Effekt von Tellurit ein ähnliches Wirkprinzip zugrunde liegen.

Im Vergleich zur Entwicklung neuer Antibiotika stellt diese Gruppe von antibiotischen Adjuvantien eine kostengünstige Alternative für die Suche nach neuen Behandlungsstrategien von multiresistenten Pathogenen dar (Bernal *et al.*, 2013). Im Fall von Tellurit wird vermutet, dass aufgrund der zahlreichen zellulären Zielstrukturen dieser Verbindung, die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von Resistenzen gegenüber einer Kombination aus diesem Adjuvant und einem Antibiotikum gering ist (Molina-Quiroz *et al.*, 2012). Damit stellt die Kombination aus Tellurit und einem Antibiotikum einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung von *P. aeruginosa*-bedingten Infektionen dar.

3.3 Der Einfluss von Tellurit auf die Wirksamkeit von Antibiotika ist konzentrationsabhängig und synergistisch

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Tellurit die Wirksamkeit von Ceftazidim, Ciprofloxacin und Tobramycin steigert (siehe Kapitel 3.2). Es stellte sich die Frage, ob der durch Tellurit vermittelte Antibiotika-verstärkende Effekt konzentrationsabhängig ist. Dazu wurde das uropathogene *P. aeruginosa*-Isolat RN21 auf Nähragarplatten mit verschiedenen Telluritkonzentrationen ausgestrichen und mit den Antibiotika Ciprofloxacin und Tobramycin behandelt. Die Abbildungen 7 und 8 zeigen den Einfluss der Telluritkonzentration auf die Wirksamkeit von Ciprofloxacin und Tobramycin.

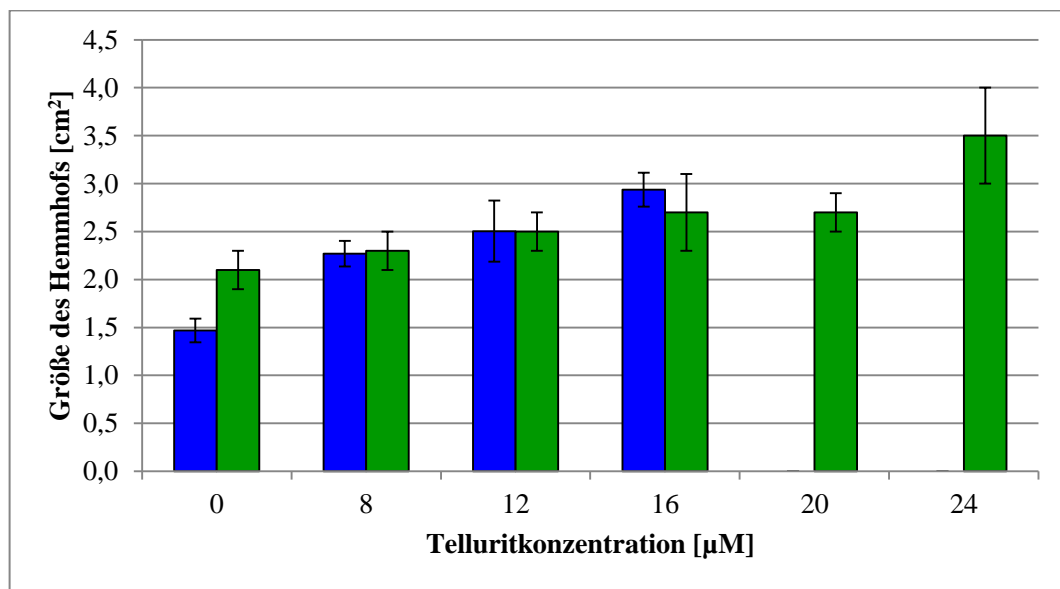


Abbildung 7: Einfluss der Telluritkonzentration auf die Sensitivität des uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolats RN21 gegenüber Ciprofloxacin. Es wurden Nähragarplatten mit unterschiedlichen Telluritkonzentrationen sowie eine Ciprofloxacinkonzentration von 12 µg/ml verwendet. Die Inkubation erfolgte aerob bei 37 °C für 18 h. Blau: 1:10 LB-Agarplatten, grün: AUM-Agarplatten. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit den Standardabweichungen. Das Experiment wurde gemeinsam mit W. Michel durchgeführt.

Bei Ciprofloxacin nahm die Größe der Hemmhöfe bei steigender Telluritkonzentration auf AUM- und auf 1:10 LB-Agar zu. Im Vergleich zu 1:10 LB-Agar war dieser Effekt auf

AUM-Agar weniger stark ausgeprägt. Ein deutlicher Unterschied konnte erst bei der höchsten getesteten Telluritkonzentration von 24 μM beobachtet werden. Die Größe des Hemmhofs nahm im Vergleich zur Hemmhofgröße in Abwesenheit von Tellurit um den Faktor 1.7 zu. Auf 1:10 LB-Agar konnte ab einer Telluritkonzentration von 16 μM kein Wachstum des uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolats RN21 beobachtet werden. Verglichen mit der Hemmhofgröße in Abwesenheit von Tellurit verdoppelte sich die Größe des Hemmhofs bei einer Telluritkonzentration von 16 μM . Im vorherigen Kapitel konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Kombination aus Tellurit und Ciprofloxacin auf 1:10 LB-Agar wirksamer ist als auf AUM-Agar.

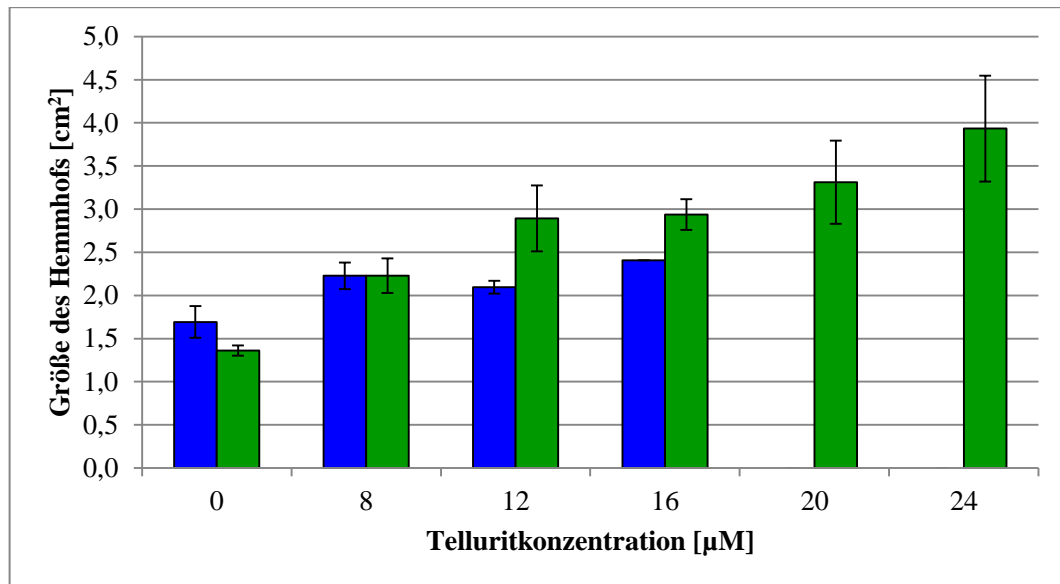


Abbildung 8: Einfluss der Telluritkonzentration auf die Sensitivität des uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolats RN21 gegenüber Tobramycin. Es wurden Nähragarplatten mit unterschiedlichen Telluritkonzentrationen sowie eine Tobramycinkonzentration von 82 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Die Inkubation erfolgte aerob bei 37 °C für 18 h. Blau: 1:10 LB-Agarplatten, grün: AUM-Agarplatten. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit den Standardabweichungen. Das Experiment wurde gemeinsam mit W. Michel durchgeführt.

Auf 1:10 LB-Agar unterschieden sich bei Tobramycin die Größen der Hemmhöfe in Anwesenheit von unterschiedlichen Telluritkonzentrationen geringfügig voneinander. Die Kombination von Tobramycin und einer Telluritkonzentration von größer als 16 μM

hemmte das Wachstum des *P. aeruginosa*-Isolats RN21. Dagegen nahm die Hemmhofgröße auf AUM-Agar bei steigenden Telluritkonzentrationen kontinuierlich zu. Verglichen mit der Größe des Hemmhofs in Abwesenheit von Tellurit verdreifachte sich die Hemmhofgröße bei einer Telluritkonzentration von 24 μM fast. Im Kapitel 3.2 konnte ebenfalls beobachtet werden, dass das uropathogene *P. aeruginosa*-Isolat RN21 auf AUM-Agar sensibler auf die Kombination aus Tellurit und Tobramycin reagierte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Wirksamkeit der getesteten Antibiotika mit steigender Telluritkonzentration zunimmt. Somit ist der von Tellurit vermittelte Antibiotika-verstärkende Effekt konzentrationsabhängig. Molina-Quiroz und Kollegen beobachteten ebenfalls, dass sich die Wirksamkeit des Antibiotikums Cefotaxim bei *E. coli* proportional zur Telluritkonzentration verhält (Molina-Quiroz *et al.*, 2012). Dieser Zusammenhang bestätigt die Annahme, dass es sich um einen synergistischen Effekt handelt, der ursächlich für die verbesserte Wirksamkeit von Antibiotika bei Telluritzugabe ist. Je höher die Konzentration des Adjuvants, desto besser wirkt das Antibiotikum.

Insgesamt besaß die Telluritkonzentration auf AUM-Agar einen deutlicheren Effekt auf die Wirksamkeit der getesteten Antibiotika als auf 1:10 LB-Agar. Einen Einfluss der Nährstoffzusammensetzung des Mediums auf den Antibiotika-verstärkenden Effekt von Tellurit konnte auch im vorherigen Kapitel beobachtet werden. Auf AUM-Agar reagierten die uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate und *P. aeruginosa* PAO1 sensibler auf die Kombination aus Tellurit und Tobramycin als auf 1:10 LB-Agar. Mit Ausnahme des uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolats MH19 reagierten die weiteren Isolate sowie *P. aeruginosa* PAO1 auf 1:10 LB-Agar sensibler auf die Kombination aus Tellurit und Ciprofloxacin als auf AUM-Agar. Einen Einfluss der Nährstoffzusammensetzung des Mediums wurde bereits bei der Antibiotikaltoleranz uropathogener *P. aeruginosa*-Isolate beschrieben (Narten, 2011). Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die Antibiotikaempfindlichkeit bei den verwendeten *P. aeruginosa*-Isolaten im Vergleich zu 1:10 LB in AUM verringert. Gegenüber Tobramycin konnte eine ca. 4-fach und gegenüber Ciprofloxacin eine ca. 3-fach reduzierte Empfindlichkeit in AUM beobachtet werden (Narten, 2011). Es wurde vermutet, dass der unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen herrschende Eisenmangel ursächlich für die erhöhte Antibiotikaresistenz ist (Narten, 2011).

Bei *E. coli* konnte beobachtet werden, dass Eisenmangel zu einer erhöhten Resistenz gegenüber dem Beta-Laktam-Antibiotikum Mecillinam führt (Vinella *et al.*, 2005). Die u. a. durch Eisenmangel induzierte Aktivierung der „stringent response“ führt zu einem erhöhten Gehalt an ppGpp (Vinella *et al.*, 2005), wobei die Akkumulation von ppGpp die Inhibition der Peptidoglykansynthese bewirkt (Poole, 2012a). Neben der Antibiotikasensitivität werden zahlreiche andere physiologische Vorgänge durch die Aktivierung der „stringent response“-vermittelte Modulation des ppGpp-Gehalts beeinflusst (Poole, 2012a). Des Weiteren führt ein Mangel an Aminosäuren, Phosphat (P_i), Kohlenstoffquellen und Fettsäuren zur Aktivierung der „stringent response“ (Sharma & Chatterji, 2010). Die verwendeten Medien stellen unterschiedliche Nährstoffe für das Wachstum der uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate bereit (siehe Tabelle 5). Damit könnte eine Veränderung des Stoffwechsels basierend auf der Nährstoffverfügbarkeit ursächlich für den beobachteten Medien-abhängigen Einfluss von Tellurit auf die Wirksamkeit von Antibiotika sein. Allerdings konnten bezüglich des scheinbar Medien-abhängigen Effekts von Tellurit auf die Antibiotikawirksamkeit keine einheitlichen Ergebnisse beobachtet werden. Tendenziell wurde die Wirksamkeit von Ciprofloxacin in 1:10 LB stärker durch Tellurit beeinflusst. Während die Wirksamkeit von Tobramycin in AUM stärker durch Tellurit beeinflusst wurde. Somit könnte auch der Wirkmechanismus der verwendeten Antibiotika entscheidend sein.

3.4 Tellurit wirkt nicht zytotoxisch auf humane Epithelzellen in antimikrobiell wirksamen Konzentrationen

Für Tellurit konnte ein Antibiotika-verstärkender Effekt auf uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate nachgewiesen werden. Mit diesem Ergebnis ist die Möglichkeit verbunden, Tellurit als Adjuvant bei einer Antibiotikabehandlung zu verwenden. Deshalb wurde überprüft, ob Tellurit toxisch für humane Zellen ist. Dazu wurde die ECV 304-Zelllinie (humane Epithelzellen) mit unterschiedlichen Telluritkonzentrationen für 2, 4 bzw. 8 Stunden inkubiert. Als Kontrolle diente das Zellkulturmedium Quantum 286 ohne Zusätze. Abbildung 9 zeigt die Überlebensraten der verwendeten Zellkulturlinie, welche mittels MTT-Test bestimmt wurden (siehe Kapitel 2.4.1).

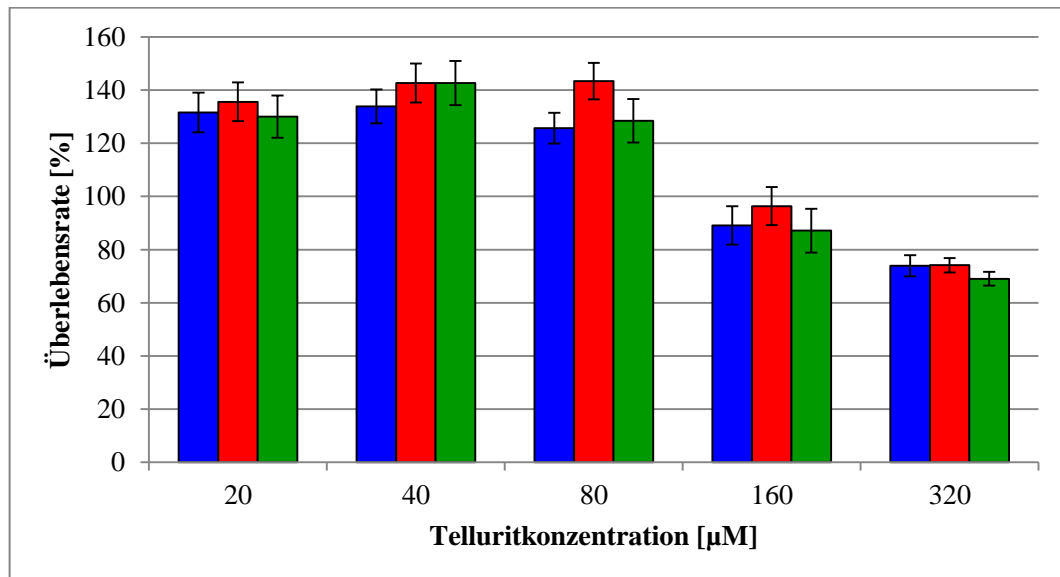


Abbildung 9: Überlebensrate von Epithelzellen (ECV304) nach der Inkubation für 2, 4 und 8 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Tellurit. Dargestellt sind die Mittelwerte aus sechs unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten in 5-fache Bestimmung mit dem Standardfehler. Blau: 2 h Inkubation, rot: 4 h Inkubation, grün: 8 h Inkubation. Das Experiment wurde gemeinsam mit W. Michel durchgeführt.

Bei einer Telluritkonzentration von 20 µM, 40 µM und 80 µM lag die Überlebensrate der Epithelzellen bei über 100 %. Die getesteten Konzentrationen besaßen keinen Einfluss auf

die Zellvitalität und waren nicht toxisch. Bei einer Telluritkonzentration von 160 μM überlebten ungefähr 90 % der Epithelzellen. Die Überlebensraten der Epithelzellen lagen bei einer Telluritkonzentration von 320 μM zwischen 70 und 75 %. Die eingesetzten Konzentrationen beeinflussten die zelluläre Vitalität und wirkten toxisch. Bezüglich der Toxizität von Tellurit für eukaryotische Zellen ist wenig bekannt (Molina-Quiroz *et al.*, 2012). Experimente mit unterschiedlichen Zellkulturlinien zeigten, dass die für eukaryotische Zellen toxische Telluritkonzentration variiert. Bei TLT-Zellen (murine hepatozelluläre Karzinom-Zelllinie) wirkt Tellurit ab 100 μM toxisch (Sandoval *et al.*, 2010). Ein zytotoxischer Effekt von Tellurit konnte bei K563-Zellen (humane chronisch-myeloische Leukämie-Zelllinie) ab einer Konzentration von 500 μM beobachtet werden (Sandoval *et al.*, 2012). Versuche mit humanen Ovarial- und Lungenkarzinom-Zellen zeigten, dass Tellurit ab einer Konzentration von 60 μM toxisch wirkt (Rigobello *et al.*, 2009). In dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen den Überlebensraten und der Inkubationszeit beobachtet werden. Die zuvor genannten und weitere Studien belegten, dass der zytotoxische Effekt von Tellurit sowohl von der Konzentration als auch von der Inkubationszeit abhängig ist (Ding *et al.*, 2002; Rigobello *et al.*, 2009; Sandoval *et al.*, 2010, 2012). Die Epithelzellen wurden unterschiedlich lang mit den jeweiligen Telluritkonzentrationen behandelt. In dieser Arbeit betrug die maximale Inkubationszeit 8 h. In den anderen Veröffentlichungen lag die Inkubationszeit zwischen 2 und 24 h. Möglicherweise waren die gewählten Inkubationszeiten zu gering, um einen zeitlichen Einfluss auf die Zytotoxizität von Tellurit zu detektieren. Die mit dem Antibiotika-verstärkenden Effekt von Tellurit verbundenen neuen therapeutischen Ansätze setzen voraus, dass Tellurit über einen längeren Zeitraum hinweg nicht toxisch auf eukaryontische Zelllinien wirkt. Folglich muss in weiterführenden Experimenten bezüglich der Zytotoxizität von Tellurit eine längere Inkubationszeit gewählt werden.

Der Antibiotika-verstärkende Effekt von Tellurit konnte für Konzentrationen, die im subletalen Bereich lagen, nachgewiesen werden. Die eingesetzten Konzentrationen von Tellurit lagen zwischen 4 μM und 46.7 μM . In diesem Konzentrationsbereich konnte kein zytotoxischer Effekt von Tellurit nachgewiesen werden. Lediglich die für das uropathogene *P. aeruginosa*-Isolat MH19 verwendete Telluritkonzentration von 218.7 μM wirkt demnach

zytotoxisch. Anhand der ermittelten Überlebensrate kann davon ausgegangen werden, dass der zytotoxische Effekt dieser Konzentration gering ist. Eukaryotische Zellen scheinen weniger sensitiv gegenüber Tellurit zu sein als prokaryotische Zellen. Somit wäre die Verabreichung von Antibiotika in Kombination mit Tellurit möglich. Ein vergleichbarer Ansatz stellt die Verwendung von Silber dar. In Form von metallischem Silber, Silbernitrat und Silbersulfadiazin wird es zur Behandlung von Verbrennungen, Wunden und anderen bakteriellen Infektionen eingesetzt (Rai *et al.*, 2009). Die antimikrobielle Eigenschaft hängt von der Menge und Freisetzung von Silber ab. Silber ist inert und wird von Säugetierzellen und bakteriellen Zellen nur schwach absorbiert. Hautfeuchtigkeit, Wundflüssigkeit oder andere Sekrete bewirken eine Ionisierung von Silber, wodurch hoch reaktive Silberione entstehen (Atiyeh *et al.*, 2007; Castellano *et al.*, 2007). Es ist beschrieben worden, dass Silberione antimikrobiell wirken und die Wirksamkeit von Antibiotika verbessern (siehe Kapitel 3.2). Zytotoxische Effekte von Silber und Silberionen sind bekannt. Folglich muss bei der Therapie mit silberhaltigen Materialien die Balance zwischen antimikrobieller Wirksamkeit und Zytotoxizität gefunden werden. Daher wird empfohlen die Menge an Silber im Plasma oder im Urin zu überprüfen (Poon & Burd, 2004; Atiyeh *et al.*, 2007; Burd *et al.*, 2007). Silber bzw. Silberverbindungen werden u.a. als Bestandteil von Wundauflagen, -verbänden und -salben eingesetzt. Des Weiteren werden silberbeschichtete Blasenkateter verwendet (Silver, 2003; Leaper, 2006; Abedini *et al.*, 2013). Es wird angenommen, dass silberbeschichtete Blasenkatetern eine reduzierte Biofilmbildung bewirken und/oder dass durch freigesetzte Silberionen eine verminderte Kolonisation erfolgt (Beattie & Taylor, 2011). Chaw und Kollegen zeigten, dass Silberionen zur Destabilisierung der Biofilmstruktur von *Staphylococcus epidermidis* führen. Sie vermuteten, dass sich durch die Bindung von Silberionen an Komponenten der Biofilmmatrix die Bindungsstellen für mögliche Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische sowie hydrophobe Wechselwirkungen minimieren (Chaw *et al.*, 2005). Bei *Pseudomonas fluorescens* konnte beobachtet werden, dass Magnesiumionen die Biofilmbildung beeinflussen (Song & Leff, 2006). Des Weiteren zeigten Hancock und Kollegen, dass Zink- und Cobaltionen die Biofilmbildung von uropathogenen *E. coli*-Stämmen beeinträchtigen. Die verwendeten divalenten Metallionen zeichnen sich durch

eine hohe Affinität gegenüber dem Eisenaufnahmeregulator Fur aus (Hancock *et al.*, 2010). Der Regulator Fur vermittelt in Kombination mit zweiwertigem Eisen als Cofaktor die Repression von Genen, welche für Komponenten der Eisenaufnahme kodieren (Cornelis *et al.*, 2009). Somit würde durch die Bindung von anderen divalenten Metallionen an den Regulator Fur eine Inhibition der Eisenaufnahme erfolgen, wobei Eisen wichtig für die Bildung von Biofilmen ist (Hancock *et al.*, 2008; Hancock *et al.*, 2010). Des Weiteren wurde beschrieben, dass zwitterionische Polymere die bakterielle Adhäsion und Biofilmbildung inhibieren (Cheng *et al.*, 2007). Somit ergibt sich für Tellurit in Form von telluritbeschichteten Blasenkathetern eine weitere Anwendungsmöglichkeit. Neben dem Antibiotika-verstärkenden Effekt könnte sich Tellurit auch durch eine mögliche Beeinträchtigung der Biofilmbildung positiv auf die Therapie von CAUTIs auswirken. Der infektionspräventive Effekt von telluritbeschichteten Blasenkathetern müsste noch überprüft werden.

3.5 Tellurit erhöht die intrazelluläre Bildung von ROS

Im Kapitel 3.2 wurde vermutet, dass ein sich aus der Interaktion zwischen Tellurit und Antibiotika ergebender synergistischer Effekt ursächlich für die beobachtete verbesserte Wirksamkeit von Antibiotika in Anwesenheit von Tellurit ist. In diesem Zusammenhang wurde beschrieben, dass sowohl Antibiotika als auch Tellurit die Produktion von ROS bewirken (Kohanski *et al.*, 2007; Chasteen *et al.*, 2009; Dwyer *et al.*, 2009). Hierbei handelt es sich um toxische Sauerstoffderivate, welche u. a. während aerober Stoffwechselprozesse entstehen (Bayir, 2005). Die an der Detoxifizierung von ROS beteiligten zellulären Mechanismen sind in Kapitel 1.7 beschrieben. Daher wurde vermutet, dass der Antibiotika-verstärkende Effekt von Tellurit aus einer erhöhten Menge an ROS resultieren (Molina-Quiroz *et al.*, 2012). Mittels Luminol und anschließender Messung der Chemilumineszenz (siehe Kapitel 2.4.2) sollte überprüft werden, ob die Kombination aus einem Antibiotikum und Tellurit zu einer gesteigerten Bildung von ROS führt. Dazu wurden die uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate und der Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 mit dem einfachen MIC-Wert des Antibiotikums in An- bzw. Abwesenheit des einfachen MIC-Werts von Tellurit kultiviert (siehe Kapitel 2.4.2). Da Tellurit in artifiziellm Urinmedium präzipitiert, konnten die entsprechenden MIC-Werte nicht ermittelt werden. Daher wurde für die Bestimmung der ROS-Menge ausschließlich 1:10 LB verwendet. Wobei die Wachstumsraten von *P. aeruginosa* in 1:10 LB mit denen in artifiziellm Urinmedium vergleichbar sind (N. Rosin, 2010). In den Tabellen 18 und 19 sind die gemessenen relativen Lichteinheiten (RLE) in Anwesenheit von Ciprofloxacin bzw. Tobramycin und/oder Tellurit aufgelistet. Dabei sind die relativen Lichteinheiten ein indirektes Maß für die ROS-Menge. Zur besseren Veranschaulichung sind in den Abbildungen 10 und 11 exemplarisch die Ergebnisse des uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolats MH27 dargestellt.

Tabelle 18: Die intrazelluläre ROS-Menge, ausgedrückt in relative Lichteinheiten (RLE) pro $1 \cdot 10^6$ Zellen, von den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten MH19, MH27, MH38 und RN21 sowie von dem Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit des einfachen MIC-Wertes von Ciprofloxacin und/oder von Tellurit in 1:10 LB. Die Negativkontrolle wurde frei von Ciprofloxacin und Tellurit inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit dem Standardfehler. Das Experiment wurde gemeinsam mit J. Kreibich durchgeführt.

<i>P. aeruginosa</i> - Isolat	Ciprofloxacin [RLE/ $1 \cdot 10^6$ Zellen]	Ciprofloxacin & Tellurit [RLE/ $1 \cdot 10^6$ Zellen]	Tellurit [RLE/ $1 \cdot 10^6$ Zellen]	NK [RLE/ $1 \cdot 10^6$ Zellen]
MH19	21,388.92 \pm 119.83	3,795,185.19 \pm 620,322.52	3,488,148.15 \pm 210,205.29	15,65 \pm 0.25
MH27	98.69 \pm 23.67	619.10 \pm 107.85	357.53 \pm 11.74	8.06 \pm 1.39
MH38	117.64 \pm 3.56	278.44 \pm 62.91	164.98 \pm 46.43	36.61 \pm 9.34
RN21	304.05 \pm 38.37	7,522.55 \pm 1228.10	1,377.48 \pm 75.11	36.59 \pm 4.36
PAO1	102.12 \pm 22.21	457.26 \pm 70.89	292.34 \pm 80.04	8.53 \pm 0.52

Bei allen getesteten Stämmen konnten ROS in Anwesenheit des Antibiotikums und/oder von Tellurit nachgewiesen werden. Bei der Negativkontrolle konnte eine vergleichsweise geringe Menge an ROS detektiert werden.

In den Ansätzen mit Ciprofloxacin und Tellurit wurden am meisten ROS gebildet. In Anwesenheit von Tellurit wurde mehr ROS gebildet als in Anwesenheit von Ciprofloxacin. Diese Tendenz konnte bei allen getesteten Stämmen beobachtet werden. Allerdings war die Menge an gebildeten ROS unterschiedlich. Bei dem uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolat MH19 konnten bei allen getesteten Substanzen die höchste Menge an ROS detektiert werden. Die von den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten MH27, RN21 und dem Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 gebildeten Menge an ROS lagen im mittleren Bereich. Bei dem uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolat MH38 wurde die geringste Menge an ROS nachgewiesen.

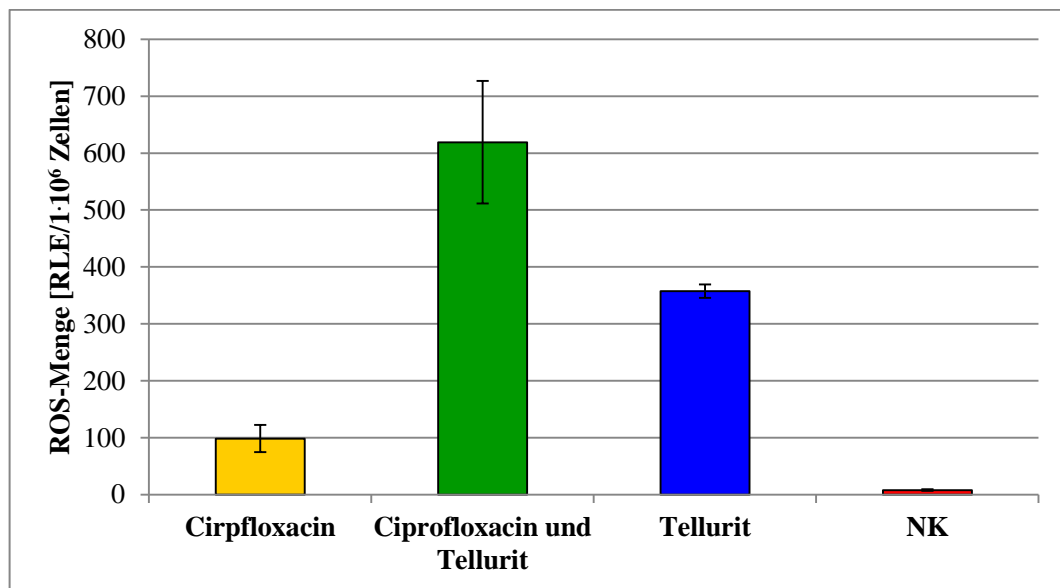


Abbildung 10: Die intrazelluläre ROS-Menge, ausgedrückt in relative Lichteinheiten (RLE) pro $1 \cdot 10^6$ Zellen, von dem uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolat MH27 in Anwesenheit des einfachen MIC-Wertes von Ciprofloxacin und/oder von Tellurit in 1:10 LB. Die Negativkontrolle wurde frei von Ciprofloxacin und Tellurit inkubiert. Gelb: Ciprofloxacin, grün: Ciprofloxacin und Tellurit, blau: Tellurit, rot: Negativkontrolle (NK). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit dem Standardfehler. Das Experiment wurde gemeinsam mit J. Kreibich durchgeführt.

Tabelle 19: Die intrazelluläre ROS-Menge, ausgedrückt in relative Lichteinheiten (RLE) pro $1 \cdot 10^6$ Zellen, von den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten MH19, MH27, MH38 und RN21 sowie von dem Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit des einfachen MIC-Wertes von Tobramycin und/oder von Tellurit in 1:10 LB. Die Negativkontrolle wurde frei von Ciprofloxacin und Tellurit inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit dem Standardfehler. Das Experiment wurde gemeinsam mit J. Kreibich durchgeführt.

<i>P. aeruginosa</i> - Isolat	Tobramycin [RLE/ $1 \cdot 10^6$ Zellen]	Tobramycin & Tellurit [RLE/ $1 \cdot 10^6$ Zellen]	Tellurit [RLE/ $1 \cdot 10^6$ Zellen]	NK [RLE/ $1 \cdot 10^6$ Zellen]
MH19	94,740.81± 60,011.39	10,224,791.67± 3,853,388.57	3,488,148.15± 210,205.29	17.81±1.82
MH27	9.201±1.09	292,580.88± 24,618.39	260.41±61.95	7.12±1.33
MH38	46.72±8.61	32,790.93± 11,241.03	257.15±96.07	26.21±0.436
RN21	55.65±12.46	888,447.45± 67,170.17	891.24±147.79	31.81±1.27
PAO1	7.85±1.73	381,230.80± 120,073.12	315.91±21.38	7.33±1.48

Bei Tobramycin und/oder Tellurit konnten im Vergleich zu Ciprofloxacin und/oder Tellurit die gleichen Effekte beobachtet werden. In Anwesenheit von Tellurit und Tobramycin war die Menge an ROS bei allen getesteten Stämmen am höchsten. Dabei konnten mehr ROS in Anwesenheit von Tellurit als in Anwesenheit von Tobramycin nachgewiesen werden. Bei dem uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolat MH27 und dem Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 waren die in der Negativkontrolle und die in Anwesenheit von Tobramycin gebildeten ROS-Mengen vergleichbar. Unter diesen Testbedingungen unterschieden sich die ROS-Mengen bei den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten MH38 und RN21 geringfügig voneinander. Bei allen getesteten Bedingungen unterschieden sich die uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate und der Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 bezüglich der ROS-Menge. Bei dem Isolat *P. aeruginosa* MH19 konnte die höchste Menge an ROS

detektiert werden. Dagegen produziert das Isolat *P. aeruginosa* MH38 die geringste Menge an ROS. Die übrigen Isolate lagen bezüglich der gebildeten ROS-Menge im mittleren Bereich. Die Kombination aus Tobramycin und Tellurit führte bei den getesteten Stämmen zu einer höheren Menge an ROS als die Kombination aus Ciprofloxacin und Tellurit.

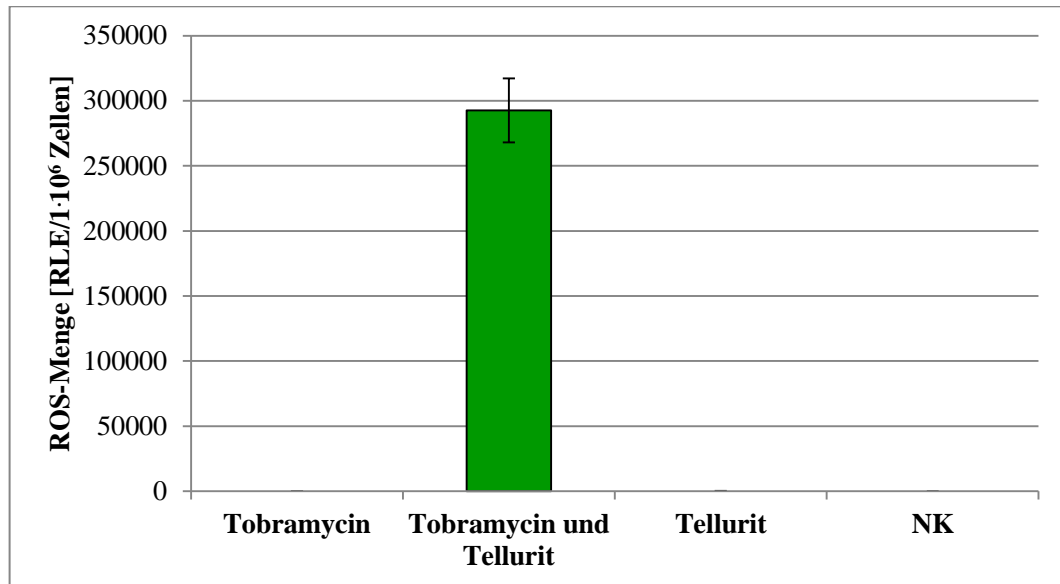


Abbildung 11: Die intrazelluläre ROS-Menge, ausgedrückt in relative Lichteinheiten (RLE) pro $1 \cdot 10^6$ Zellen, von dem uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolat MH27 in Anwesenheit des einfachen MIC-Wertes von Tobramycin und/oder von Tellurit in 1:10 LB. Die Negativkontrolle wurde frei von Tobramycin und Tellurit inkubiert. Gelb: Tobramycin, grün: Tobramycin und Tellurit, blau: Tellurit, rot: Negativkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit dem Standardfehler. Das Experiment wurde gemeinsam mit J. Kreibich durchgeführt.

Die Experimente zeigten, dass die Kombination aus einem Antibiotikum und Tellurit eine gesteigerte Bildung von ROS bei den getesteten uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten und dem Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 bewirkt. Bezüglich der ROS-Produktion ist die Gesamtwirkung des Antibiotikums und von Tellurit größer als die Summe ihrer Einzelwirkungen. Entsprechend der Definition von Synergie nach Kalan und Wright wäre die beobachtete verbesserte Wirksamkeit von Antibiotika bei Telluritzugabe auf einen synergistischen Effekt zurück zu führen (Kalan & Wright, 2011). Ähnliches wurde für die Kombinationstherapie von Antibiotika beschrieben. Die Antibiotika Sulfamethoxazol und

Trimethoprim inhibieren aufeinander folgende Schritte innerhalb der Folsäure-Biosynthese. Einzeln verabreicht wird die Biosynthese von Folsäure nicht komplett verhindert und sie wirken jeweils bakteriostatisch (Masters *et al.*, 2003; Kalan & Wright, 2011). Ein synergistischer Effekt ist auch für die Kombination aus dem Beta-Laktam-Antibiotikum Penicillin mit einem Aminoglykosid-Antibiotikum beschrieben worden. Es wurde vermutet, dass die Penicillin-vermittelte Beeinträchtigung der Zellwandsynthese die Aufnahme des Aminoglykosid-Antibiotikums fördere (Kalan & Wright, 2011). Ähnlich wie bei Tellurit und Antibiotika wurde bei der Kombination aus dem Beta-Laktam-Antibiotikum Gentamycin mit dem Aminoglykosid-Antibiotikum Ampicillin angenommen, dass der synergistische Effekt das Resultat einer erhöhten Menge an ROS sei (Barnes *et al.*, 2005). Des Weiteren konnte eine Synergie zwischen speziellen chemischen Verbindungen und Antibiotika beobachtet werden. Tomatidin, die Aglycon-Form des pflanzlichen Sekundärmetabolits Tomatin, wirkt synergistisch mit Aminoglykosiden bei multiresistenten *S. aureus*-Stämmen (Mitchell *et al.*, 2011, 2012). Ähnliches ist für den aus Desferrioxamin und Gallium bestehenden Komplex beschrieben worden. In einem Infektionsmodell konnte gezeigt werden, dass dieser Komplex die Wirksamkeit von Gentamycin bei der Therapie von *P. aeruginosa*-assoziierter Keratitis verbessert (Banin *et al.*, 2008).

Es wurde vermutet, dass der von Antibiotika induzierte oxidative Stress (Kohanski *et al.*, 2007; Dwyer *et al.*, 2009) durch die während der Reduktion von Tellurit gebildeten ROS (Tremaroli *et al.*, 2007) verstärkt wird (Molina-Quiroz *et al.*, 2012). Bei den getesteten uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten und dem Laborstamm *P. aeruginosa* PA01 konnte in Anwesenheit von Tellurit die Produktion von ROS nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang ist beschrieben worden, dass während der Reduktion von Tellurit zum weniger toxischen Tellur Superoxidanionen entstehen, welche Eisen-Schwefel-Zentren zerstören. Das dabei freigesetzte Eisen vermittelt die Reduktion von Wasserstoffperoxid. Dies führt zur Entstehung von Hydroxylradikalen, welche direkt Biomoleküle wie DNA, Proteine und Lipide schädigen (Chasteen *et al.*, 2009). Für bakterizide Antibiotika wird angenommen, dass sie neben dem primären Wirkmechanismus eine zusätzliche Schädigung von zellulären Komponenten durch die Induktion von zellulärem oxidativem Stress verursachen (Becerra & Albasa, 2002; Dwyer *et al.*, 2007; Dwyer *et al.*, 2009; Kohanski *et*

al., 2007; Wang & Zhao, 2009; Wang *et al.*, 2010). Es wurde postuliert, dass bakterizide Antibiotika durch die Beeinflussung des Metabolismus und der Zellatmung eine erhöhte Produktion von Superoxidanionen mit den zuvor beschriebenen Konsequenzen bewirken (Kohanski *et al.*, 2008; Kohanski *et al.*, 2010). Bei den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten und dem Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 konnte in Anwesenheit von Ciprofloxacin ROS nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu waren die bei Tobramycin detektierten ROS-Mengen mit denen der Negativkontrolle vergleichbar bzw. es konnten keine deutlichen Unterschiede beobachtet werden. Das uropathogene *P. aeruginosa*-Isolat MH19 stellte die Ausnahme dar. Ähnliches geht aus zwei Studien hervor. Es konnten keine Hinweise darauf gefunden werden, dass ROS an dem Wirkmechanismus von Antibiotika beteiligt sind (Liu & Imlay, 2013; Keren *et al.*, 2013). Damit bleibt die Beteiligung von ROS an der Wirkung von Antibiotika strittig.

Die uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate und der Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 unterschieden sich bezüglich der detektierten Menge an ROS. Eine Heterogenität konnte bereits bei der Reaktion der verwendeten Stämme gegenüber der Kombination aus Antibiotikum und Tellurit beobachtet werden (siehe Kapitel 3.3). Unter der Annahme, dass eine erhöhte ROS-Produktion ursächlich für den Antibiotika-verstärkenden Effekt von Tellurit ist, wurden die Steigerungsrate und die detektierte ROS-Menge miteinander verglichen (siehe Tabelle 17, 18, 19). Die Steigerungsrate drückt die prozentuale Zunahme der Hemmhofgröße in Anwesenheit von Tellurit aus. Damit stellt dieser Wert einen Indikator für die Wirksamkeit des jeweiligen Antibiotikums bei Telluritzugabe dar. Bei der Kombination aus Tobramycin und Tellurit konnte ein Zusammenhang zwischen Steigerungsrate und ROS-Menge beobachtet werden. Bei dem uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolat MH19 konnte die höchste Menge an ROS nachgewiesen werden und die Zunahme der Hemmhofgröße in Anwesenheit von Tellurit war am größten. Dagegen wies der Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 die geringste ROS-Menge und zugleich niedrigste Zunahme der Hemmhofgröße bei Telluritzugabe auf. Bei dem uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolat MH38 konnte erst bei Telluritzugabe ein Hemmhof beobachtet werden. Die Kombination aus Tobramycin und Tellurit führte bei diesem Isolat zur dritthöchsten ROS-Menge. Bei der Kombination aus Ciprofloxacin und Tellurit konnte kein

deutlicher Zusammenhang zwischen Steigerungsrate und ROS-Produktion beobachtet werden. Damit könnte die unterschiedliche ROS-Menge ursächlich für die isolatspezifische Reaktion gegenüber der Kombination aus Antibiotikum und Tellurit sein. Neben den in Kapitel 1.7 beschriebenen Mechanismen zur Detoxifizierung von ROS könnte die intrazelluläre ROS-Konzentration auch durch eine adaptive Antwort auf Sauerstoffderivate beeinflusst werden. In diesem Zusammenhang ist beschrieben worden, dass ROS als Signalmoleküle fungieren. Bei *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die durch Wasserstoffperoxid vermittelte Aktivierung des Regulators OxyR über zahlreiche Mechanismen zur Reduktion der intrazellulären Konzentration von zweiwertigem Eisen führt. Dies wirkt der Generierung von Hydroxylradikalen durch die Fenton-Reaktion entgegen (Faulkner & Helmann, 2011). OxyR aktiviert die Expression des Gens *Dps*, einem Ferritin-ähnlichen Protein mit Ferroxidase-Aktivität. Es oxidiert gebundenes zweiwertiges Eisen zu dreiwertigem Eisen (Nair, & Finkel, 2004). Bei dieser Reaktion entstehen keine Hydroxylradikale. Dadurch wird einer potentiellen Schädigung zellulärer Komponenten durch nicht inkorporiertes zweiwertiges Eisen entgegengewirkt (Calhoun & Kwon, 2011). Des Weiteren wird die Expression von *MntH*, einem Mangan-Transporter, positiv durch OxyR beeinflusst (Faulkner & Helmann, 2011). Es wurde beschrieben, dass zweiwertiges Mangan durch eine chemische Kompetition wirkt und zweiwertiges Eisen beispielsweise in Eisen-Metalloproteinen ersetzt. Dadurch wird der durch Wasserstoffperoxid-vermittelten Oxidation von Eisen-Schwefel-Zentren, welche zur Freisetzung von zweiwertigem Eisen führt, entgegengewirkt (Anjem *et al.*, 2009; Faulkner & Helmann, 2011). Zusätzlich induziert OxyR die Expression von Fur, dem Hauptregulator der Eisenhomöostase. Die Fähigkeit von Fur, bei einer erhöhten zytosolischen Konzentration von zweiwertigen Eisen die Eisenaufnahme zu verhindern, trägt zum Schutz der Wasserstoffperoxid-vermittelten Fenton-Reaktion bei (Faulkner & Helmann, 2011). Ähnliche Mechanismen sind auch für *Bacillus subtilis*, *Deinococcus radiodurans*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pyogenes* und *Bradyrhizobium japonicum* beschrieben worden (Faulkner & Helmann, 2011). Bei *P. aeruginosa* ist der Regulator OxyR wichtig für das Hochregulieren von den Antioxidant-produzierenden Genen *katB*, *ahpB* und *ahpCF* in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (Ochsner *et al.*, 2000). Des Weiteren ist OxyR

essentiell für das Hochregulieren von Schutzmechanismen gegenüber oxidativem Stress (Vinckx *et al.*, 2010). Außerdem konnte gezeigt werden, dass OxyR zur Virulenz beiträgt sowie eine Resistenz gegenüber humanen Neutrophilen vermittelt (Lau *et al.*, 2005). Versuche mit *oxyR*-Mutanten weisen darauf hin, dass es bei *P. aeruginosa* ähnlich wie bei *E. coli* ein regulatives Zusammenspiel zwischen der Antwort auf oxidativen Stress und der Eisenhomöostase gibt (Cornelis *et al.*, 2011). Ob Adaptationsmechanismen ursächlich für die beobachtete heterogene ROS-Produktion von uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten und vom Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 sind, müsste durch weitere Experimente geklärt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass der Wirksamkeits-steigernde Effekt von Tellurit zwischen den getesteten Antibiotika variiert (siehe Kapitel 3.3). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass bei den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten und dem Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Tobramycin und Tellurit mehr ROS gebildet wurden als bei Ciprofloxacin und Tellurit. Die getesteten Antibiotika verfügen über unterschiedliche Zielstrukturen und demnach über verschiedene Wirkmechanismen. Ciprofloxacin bindet an die bakterielle Topoisomerase Typ II und Typ IV (Aldred *et al.*, 2014). Dadurch entstehen u.a. Doppelstrangbrüche in der DNA und Prozesse wie die Replikation und Transkription werden inhibiert (Blondeau *et al.*, 2004; Drlica *et al.*, 2008; Drlica *et al.*, 2009). Tobramycin bindet an die Aminoacyl-Stelle der 16S rRNA innerhalb der 30S-Untereinheit prokaryotischer Ribosomen (Schroeder *et al.*, 2000; Avent *et al.*, 2011). Diese Bindung verursacht ein ungenaues Ablesen der mRNA, was zur Entstehung von fehlerhaften Proteinen führt (Kohanski *et al.*, 2010). Molina-Quiroz und Kollegen zeigten ebenfalls, dass der Einfluss von Tellurit auf die Wirksamkeit von Antibiotika unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Bei *P. aeruginosa* und *S. aureus* führten zwei der insgesamt fünf verwendeten Antibiotika zu einem signifikanten Wirksamkeits-steigernden Effekt von Tellurit. Hierbei handelte es sich um Chloramphenicol und Gentamicin. (Molina-Quiroz *et al.*, 2012). Beide Antibiotika inhibieren die Proteinsynthese, wobei sie über unterschiedliche Zielstruktur verfügen. Chloramphenicol bindet innerhalb der 50S-Untereinheit und Gentamicin innerhalb der 30S-Untereinheit prokaryotischer Ribosomen (Kohanski *et al.*, 2010). Bei *E. coli* führten die Antibiotika Tetrazyklin, Chloramphenicol

und Cefotaxim zu einem signifikanten Wirksamkeits-steigernden Effekt von Tellurit, wobei Tellurit die Wirksamkeit von Cefotaxim am stärksten verbesserte (Molina-Quiroz *et al.*, 2012). Der Wirkmechanismus von Tetrazyklin entspricht dem von Gentamicin (Chopra & Roberts, 2001). Das Cephalosporin Cefotaxim inhibiert die bakterielle Zellwandsynthese (Walsh, 2003; Pfeifer *et al.*, 2010). Ein ähnliches Resultat ergab die Untersuchung des Antibiotika-verstärkenden Effekts von Silberionen bei *E. coli*. In dieser Studie wurde der Einfluss von Silberionen auf die Wirksamkeit von Gentamicin, Ofloxacin und Ampicillin untersucht. Hierbei war der Einfluss von Silberionen auf das Antibiotikum Gentamicin am stärksten ausgeprägt (Morones-Ramirez *et al.*, 2013). Der Antibiotika-verstärkende Effekt von Tellurit und Silberionen variiert. Dabei ist der Einfluss von Tellurit auf die Wirksamkeit von Aminoglykosiden stark ausgeprägt. Folglich scheint der Wirkungsort und/oder der Wirkmechanismus einen Einfluss auf den Antibiotika-verstärkenden Effekt von Tellurit zu besitzen. Bei Aminoglykosiden wird angenommen, dass die antibiotische Wirkung nicht ausschließlich auf deren Interaktion mit der Zielstruktur basiert (Schurek *et al.*, 2008). Dies würde bedeuten, dass der Wirkungsort bzw. die Interaktion des Antibiotikums mit der Zielstruktur keinen Einfluss auf den Wirksamkeits-steigernden Effekt von Tellurit hätte. Durch Genexpressionsstudien konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit eines Antibiotikums zahlreiche Gene differentiell reguliert vorliegen (Breidenstein *et al.*, 2008; Alvarez-Ortega *et al.*, 2010). Außerdem wirkt Tobramycin im Gegensatz zu Chloramphenicol bakterizid, obwohl beide Antibiotika die Proteinbiosynthese inhibieren (Schurek *et al.*, 2008). Dies deutet darauf hin, dass zusätzliche Wirkmechanismen des Antibiotikums den Wirksamkeits-steigernden Effekt von Tellurit beeinflussen.

3.6 Untersuchung des Wirkmechanismus der Tellurit-vermittelten Steigerung der Antibiotikawirksamkeit

Bei dem kontinuierlichen Auftreten von Bakterien, die gegenüber einer Vielzahl an Antibiotika resistent sind, handelt es sich um ein weltweites Gesundheitsproblem. Dabei stellt die Zugabe von Tellurit eine neue Strategie zur Therapie von multiresistenten Bakterien dar. In dieser Arbeit wurde ein Antibiotika-verstärkender Effekt von Tellurit bei uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten und dem Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 nachgewiesen (siehe Kapitel 3.2). Um den Mechanismus des Antibiotika-verstärkenden Effekts von Tellurit genauer zu untersuchen, wurden Transkriptomanalysen sowie ^{13}C -metabolische Flussanalysen (Fluxomanalysen) durchgeführt. Das Transkriptom stellt die zu einem bestimmten Zeitpunkt unter definierten Bedingungen exprimierten Gene dar. Somit liefert die Transkriptomanalyse Informationen über die Expressionsraten von Genen (Derks, 2014). Das Fluxom beschreibt die enzymkatalysierten Stoffumsetzungen zu einem bestimmten Zeitpunkt unter definierten Bedingungen. Damit dient die Flussanalyse u.a. zum Ermitteln der *in vivo*-Enzymaktivitäten und intrazellulären Stoffwechselreaktionsraten des zentralen Kohlenstoffwechsels (Berger, 2014).

Für diese Untersuchungen wurde der Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 parallel in Minimalmedium (Probenmaterial für die Transkriptomanalyse) und im Minimalmedium mit $[1-^{13}\text{C}]$ -Glukose (Probenmaterial für die Fluxomanalyse) kultiviert. Die Zellernte erfolgte abhängig von der OD innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase (siehe Kapitel 2.2.4 und 2.5.2). Die RNA wurde isoliert (siehe Kapitel 2.5.3) und nach dessen Qualitätskontrolle (siehe Kapitel 2.5.4) wurde das Transkriptom mittels spezifischer *Gene Expression Microarrays* für *P. aeruginosa* PAO1 (Agilent, Waldbronn, Deutschland) analysiert (siehe Kapitel 2.5.5). Die Probenaufbereitung sowie die metabolischen Flussanalysen erfolgten in Zusammenarbeit mit Antje Berger vom Institut für Bioverfahrenstechnik der TU Braunschweig. Die ^{13}C -metabolische Flussanalysen wurden, wie von Berger und Kollegen beschrieben, durchgeführt (Berger *et al.*, 2014).

3.6.1 Charakterisierung der transkriptionellen Antwort von *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit

Bei der Analyse des Transkriptionsprofils wurden nur statistisch signifikante Veränderungen ($\log FC > \pm 0.8$) bezüglich der Transkriptmenge berücksichtigt. Von *P. aeruginosa* PAO1 wurde in Anwesenheit von Ciprofloxacin bzw. von Ciprofloxacin und Tellurit das Transkriptionsprofil untersucht. Des Weiteren wurde das Transkriptionsprofil von *P. aeruginosa* PAO1 in Abwesenheit von Zusätzen (Standard) analysiert. Im Vergleich zum Standard wurde in Anwesenheit von Ciprofloxacin die Expression von 183 Genen differentiell reguliert. Dabei wurde die Expression von 156 Genen hoch- und von 27 Genen runterreguliert. Im Vergleich zum Standard lag in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit die Expression von 184 Genen differentiell reguliert vor. Dabei wurde die Expression von 112 Genen hoch- und von 72 Genen runterreguliert. Zur Identifikation von zellulären Prozessen, die durch die Zugabe von Tellurit beeinflusst worden sind, wurden zunächst Gene, deren Expression differentiell reguliert wurde, in funktionelle Gruppen eingeteilt (siehe Abbildungen 12 und 13).

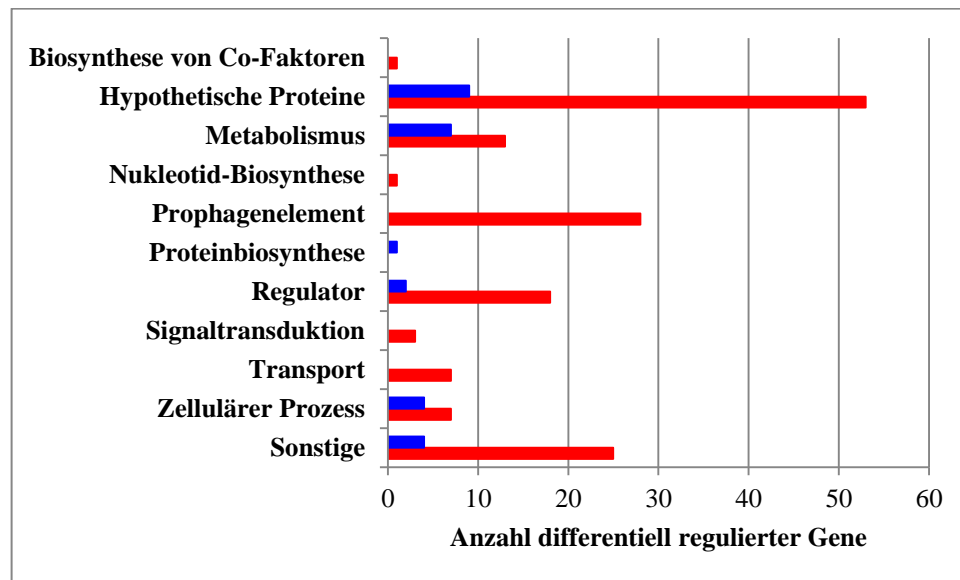


Abbildung 12: Transkriptionsprofil von *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin im Vergleich zum Standard. Dargestellt sind in Gene, deren Expression differentiell reguliert wurde. Diese Gene wurden in funktionelle Gruppe eingeteilt. Blau: runterreguliert, rot: hochreguliert.

Die Kategorie „Sonstige“ wurde beim Betrachten der Zugehörigkeit von Genen, deren Expression differentiell reguliert wurde, nicht weiter berücksichtigt. Hierbei handelte es sich um Gruppe von verschiedenen Genen, die den jeweiligen funktionellen Gruppen nicht zugeordnet werden konnten. Die für hypothetische Proteine kodierenden Gene wurden manuell nachannotiert. Genen, denen durch die manuelle Nachannotierung eine Funktion zugeordnet werden konnte, sind im Anhang in den entsprechenden Tabellen (siehe Tabelle 24 und 25) markiert. Sich aus der manuellen Nachannotierung ergebende Veränderungen bezüglich der Funktion wurden bei der Auswertung berücksichtigt.

In Anwesenheit von Ciprofloxacin gehörten die meisten Gene, deren Expression differentiell reguliert wurde, zur Gruppe der „hypothetischen Proteine“. Die weiteren Gene zählten hauptsächlich zu den Gruppen „Prophagenelement“, „Regulator“ und „Metabolismus“. Die Gene, deren Expression induziert wurde, gehörten vorrangig zu den Gruppen „hypothetischen Proteine“, „Prophagenelement“ und „Regulator“. Dagegen zählten die Gene, deren Expression reprimiert wurde, hauptsächlich zu den Gruppen „hypothetische Proteine“, „Metabolismus“ und „zellulärer Prozess“ (siehe Abbildung 12).

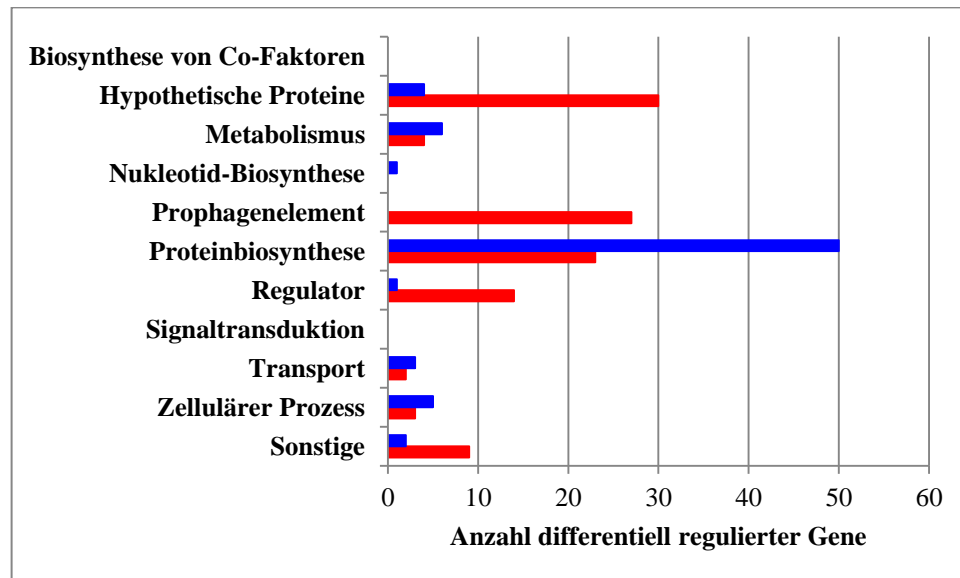


Abbildung 13: Transkriptionsprofil von *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit im Vergleich zum Standard. Dargestellt sind die Gene, deren Expression differentiell reguliert wurde. Gene eingeteilt in funktionelle Gruppen. Blau: runterreguliert, rot: hochreguliert.

In Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit zählte der Großteil der Gene, deren Expression differentiell reguliert wurde, zur Gruppe „Proteinbiosynthese“. Die weiteren Gene gehörten hauptsächlich zur Gruppe „hypothetischen Proteine“, „Prophagenelement“ und „Regulator“. Die Gene, deren Expression induziert wurde, zählten vor allem zur Gruppen „hypothetische Proteine“, „Prophagenelement“ und „Proteinbiosynthese“. Die Gene, deren Expression reprimiert wurde, gehörten hauptsächlich zur Gruppe „Proteinbiosynthese“, „Metabolismus“ und „zellulärer Prozess“ (siehe Abbildung 13). Bezogen auf die Anzahl und die Verteilung von Genen, deren Expression differentiell reguliert wurde, unterscheiden sich beide Transkriptionsprofile deutlich voneinander. Die Zugabe von Tellurit scheint somit die Genexpression zu beeinflussen, wobei der Einfluss auf den Prozess der Proteinbiosynthese besonders stark ausgeprägt zu sein scheint. Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von Tellurit auf die Genexpression wurden die Gene, deren Expression in Anwesenheit von Ciprofloxacin bzw. Ciprofloxacin und Tellurit differentiell reguliert wurde, miteinander verglichen. In dieser Arbeit wurde das Transkriptionsprofil in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit näher betrachtet. Die vollständige Liste aller Gene, deren Expression differentiell reguliert wurde, ist dem Anhang zu entnehmen (siehe Tabelle 24 und 25). Die Gene, deren Expression in beiden Transkriptionsprofilen induziert bzw. reprimiert wurde, sind in Tabelle 20 dargestellt. Tabelle 21 zeigt die Gene, deren Expression in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit differentiell reguliert wurde. Im Anhang befinden sich die vollständigen Listen von Genen, deren Expression entweder in beiden Transkriptionsprofilen oder in nur einem Transkriptionsprofil differentiell reguliert (siehe Tabelle 26 bis 28).

Tabelle 20: Übereinstimmung zwischen dem Transkriptionsprofil von *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin sowie von Ciprofloxacin und Tellurit im Vergleich zum Standard. Dargestellt sind Gene, deren Expression unter beiden Bedingungen differentiell reguliert wurde. Diese Gene wurden in die funktionellen Gruppen eingeordnet.

Funktionelle Gruppe	Anzahl der induzierten Gene	Anzahl der reprimierten Gene
Biosynthese von Co-Faktoren	0	0
Hypothetische Proteine	29	3
Metabolismus	4	0
Nukleotid-Biosynthese	0	0
Prophagenelement	27	0
Proteinbiosynthese	0	1
Regulator	12	0
Signaltransduktion	0	0
Transport	2	0
Zelluläre Funktion	3	1
Sonstige	9	0
	86	5

Ein Großteil der in beiden Transkriptionsprofilen nachgewiesenen Gene konnte der Kategorie „hypothetische Proteine“ zugeordnet werden. Somit scheinen diese Gene bei der zellulären Antwort von *P. aeruginosa* auf Ciprofloxacin bzw. Ciprofloxacin und Tellurit von Bedeutung zu sein. Damit ist eine vollständige Charakterisierung dieser Gene unerlässlich. Des Weiteren gehörten viele der in beiden Transkriptionsprofilen detektierten Gene zur Gruppe „Prophagenelement“. Dabei lag hauptsächlich die Expression von Genen aus der Region von PA0614 bis PA0646 induziert vor (siehe Tabelle 25). Die Region von PA0614 bis PA06427 kodiert für das R2- und die Region von PA0632 bis PA0648 für das F2-Pyocin. Beide weisen eine Homologie zu Bakteriophagen-ähnlichen Proteinen auf (Michel-Briand & Baysse, 2002). Bei *P. aeruginosa* wiesen Brazas und Hancock durch Genexpressionsstudien eine Ciprofloxacin-vermittelte Induktion dieser zwei Genregionen nach. Mittels elektronenmikroskopischen Aufnahmen identifizierten sie im Überstand einer mit Ciprofloxacin behandelten *P. aeruginosa*-Kultur Partikel von Bakteriophagen-Siphonen (Brazas & Hancock, 2005). Des Weiteren zeigten Chang und Kollegen, dass bei *P. aeruginosa* in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid die Expression von Genen, welche für F-, R- und S-Pyocine kodieren, induziert wird (Chang *et al.*, 2005). An der Regulation

der Expression von vielen Pyocin-Genen sind PrtR (PA0611, Repressor-Protein), PrtN (PA0610, Aktivator-Protein) und RecA (PA3617, DNA-Reparatur Protein) beteiligt (Nakayama *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2005). Diese drei Gene konnten ebenfalls in beiden Transkriptionsprofilen detektiert werden. Bezogen auf die Expressionsrate von Pyocin-Genen stimmen die in dieser Arbeit ermittelten Expressionsmuster (siehe Tabelle 23 und 24) mit denen in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (Chang *et al.*, 2005) und von Ciprofloxacin (Brazas & Hancock, 2005) überein. Diese Ergebnisse deuten auf eine durch oxidativen Stress induzierte Expression von Pyocin-Genen hin.

In beiden Transkriptionsprofilen lag die Expression der Gene *lexA* (PA3007, Repressor-Protein), *recN* (PA4763, DNA-Reparatur Protein), *recA* (PA3617, Rekombinase A), *recX* (PA3616, Rekombinationsprotein) und PA0669 (DNA-Polymerase α -Kette) induziert vor. Nach Cirz und Kollegen zählen diese Gene zum SOS-Regulon von *P. aeruginosa* (Cirz *et al.*, 2006). Ciprofloxacin verursacht Doppelstrangbrüche und induziert dadurch die SOS-Antwort (Cirz *et al.*, 2007). Dabei bindet RecA, ein SOS-Sensorprotein, an einzelsträngige DNA und aktiviert dadurch die Spaltung des Repressors LexA. Infolgedessen werden die Gene des SOS-Regulons exprimiert (Michel, 2005). Es wurde beschrieben, dass sowohl bakterizide Antibiotika als auch Tellurit die Produktion von ROS induzieren (Kohanski *et al.*, 2007; Chasteen *et al.*, 2009; Kohanski *et al.*, 2010). Dabei verursachen ROS ebenfalls Schäden an der DNA (Cabiscol *et al.*, 2000). In dieser Arbeit konnte eine erhöhte ROS-Menge in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.5). Die Kombination aus Ciprofloxacin und Tellurit führte nicht zu einer erhöhten Expressionsrate dieser Gene (siehe Tabelle 25). Somit scheint eine vermehrte Schädigung der DNA basierend auf einer erhöhten ROS-Produktion nicht ursächlich für den Antibiotika-verstärkenden Effekt von Tellurit zu sein.

Im Allgemeinen unterschieden sich die in beiden Transkriptionsprofilen nachgewiesenen Gene bezüglich ihrer Expressionsstärke. Dabei wurde in Anwesenheit von Ciprofloxacin die Genexpression stärker differentiell reguliert. Dagegen erfolgte bei ungefähr 10 % der Übereinstimmungen in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit eine stärkere differentiell Regulation. Davon lag die Expression von insgesamt fünf Genen stärker induziert und von vier Genen stärker reprimiert vor (siehe Tabelle 26). Die Gene, deren

Expression stärker induziert wurde, kodierten überwiegend für kleine regulatorische RNAs (sRNAs). Hierzu zählen die sRNAs PrrF1 (PA4704.1) und PrrF2 (PA4704.2). In *P. aeruginosa* wird die Expression von diesen nahezu identischen RNA-Transkripten von Fur reguliert (Vasil, 2007). Die beiden sRNAs kontrollieren die Transkription von Genen, welche für die Fe-Superoxiddismutase (*sodB*), die Aconitase A (*acnA*) und die Succinat-Dehydrogenase (*sdhCDAB*) kodieren. Dabei wird die Expression des Gens *sodB* negativ von den sRNAs PrrF1 und PrrF2 kontrolliert (Vasil, 2007; Cornelis *et al.*, 2009). Somit lässt sich die in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit beobachtete verstärkte Repression des Gens *sodB* (PA4366) durch die unter diesen Bedingungen nachgewiesene Induktion der Gene *prfF1* sowie *prfF2* erklären. Des Weiteren regulieren PrrF1 und PrrF2 die Gene *antAB* und *catAB*. Die von diesen Genen kodierten Komponenten sind an der Degradation von Anthranilat, einer Vorstufe des Quorum sensing (QS) - Moleküls *Pseudomonas quinolone signal* (PQS), beteiligt (Farrow & Pesci, 2007; Cornelis *et al.*, 2009). Damit verbinden die PrrF sRNAs den Eisenmetabolismus, den zentralen Kohlenstoffwechsel und die QS-Regulation miteinander (Sonnleitner & Haas, 2011).

Die Expressionsrate der sRNA PhrS (PA3305.1) war in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit ebenfalls erhöht. Sonnenleiter und Kollegen zeigten, dass in *P. aeruginosa* die sRNA PhrS die Synthese von PqsR aktiviert (Sonnleitner *et al.*, 2011). PqsR ist an der Regulation der PQS-Synthese und der Pyocyanin-Produktion beteiligt (Sonnleitner *et al.*, 2011). Durch die Analyse der Genexpression mittels quantitativer RT-PCR und *DNA Microarrays* konnte gezeigt werden, dass das Phenazin Pyocyanin an der Regulation der Eisenakquirierung beteiligt ist (Dietrich *et al.*, 2006). Zusätzlich war die Expressionsrate der sRNA RsmZ (PA3621.1) in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit erhöht. In *P. aeruginosa* kontrolliert das Zweikomponentensystem GacS-GacA die Expression der sRNAs RsmZ und RsmY. Des Weiteren modulieren zwei akzessorische Hybrid-Histidinkinasen, RetS und LadS, die Expression von RsmZ. Beide sRNAs binden an RsmA (*repressor of secondary metabolites*). RsmA beeinflusst die Expression von Genen, welche wichtig für die Virulenz, die Biofilmbildung, das QS, den Kohlenstoffwechsel und das Type III Sekretionssystem sind (Toledo-Arana *et al.*, 2007; de Bentzmann & Plésiat 2011).

Ein Teil der beschriebenen sRNAs steht in einem direkten Zusammenhang mit der Regulation der Eisenhomöostase. Da Wasserstoffperoxid mit zweiwertigen Eisen unter Bildung von Hydroxyl-Radikalen reagiert (Prousek, 2007; Valko *et al.*, 2007), ist die Kontrolle der intrazellulären Eisenkonzentration von entscheidender Bedeutung (Faulkner *et al.*, 2011). Die Induktion von Genen, welche für an der Regulation der Eisenhomöostase beteiligte Komponenten kodieren, könnte ein Hinweis auf eine erhöhte ROS-Menge sein.

Tabelle 21: Differentiell regulierten Gene von *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit im Vergleich zum Standard. Dargestellt sind Gene, deren Expression differentiell reguliert wurde. Diese Gene wurden in die funktionellen Gruppen eingeordnet.

Funktionelle Gruppe	Anzahl der induzierten Gene	Anzahl der reprimierten Gene
Biosynthese von Co-Faktoren	0	0
Hypothetische Proteine	1	1
Metabolismus	0	6
Nukleotid-Biosynthese	0	1
Prophagenelement	0	0
Proteinbiosynthese	23	49
Regulator	2	1
Signaltransduktion	0	0
Transport	0	3
Zelluläre Funktion	0	4
Sonstige	0	2

Bei *P. aeruginosa* PAO1 bewirkte die Kombination aus Ciprofloxacin und Tellurit hauptsächlich eine gesteigerte Expression von Genen, die für tRNAs kodieren (siehe Tabelle 27). Neben ihrer bekannten Funktion bei der Proteinbiosynthese sind tRNAs an der Regulation von zahlreichen metabolischen und zellulären Prozessen beteiligt (Gebetsberger & Polacek, 2013). Mit Aminosäuren verknüpfte tRNAs sind an der Bildung von nichtribosomalen Peptidbindungen, an der posttranslationalen Proteinmakierung, an der Modifikation von Phospholipiden in der Zellmembran und an der antibiotischen Biosynthese beteiligt (Raina & Ibba, 2014). Nicht beladene tRNAs fungieren als Signalmoleküle, welche die „stringent response“ (SR) aktivieren (Gebetsberger & Polacek, 2013; Raina & Ibba, 2014). Hierbei handelt es sich um ein bakterielles Regulationsnetzwerk, welches eine schnelle Anpassung an Stressbedingungen ermöglicht (Boes *et al.*, 2008). Zentrale Signalmoleküle der SR sind die Guaninnukleotide Guanosin-3'-diphosphat-5'-triphosphat (pppGpp) und Guanosin-3', 5'-bispyrophosphat, welche zusammenfassend als (p)ppGpp bezeichnet werden (Vogt *et al.*, 2011). Die Akkumulation von (p)ppGpp in der bakteriellen Zelle verändert das Transkriptionsprofil und fördert einen Wachstumstillstand durch die Inhibition der Transkription von Genen, die für Komponenten der Proteinbiosynthese kodieren (Durfee *et al.*, 2008; Traxler *et al.*, 2008). In Gram-

negativen Mikroorganismen katalysieren die Enzyme RelA und SpoT die Synthese von (p)ppGpp (Wu & Xie, 2009). Eine durch die Mutation von *relA* und *spoT* induzierte SR-Inaktivierung führte bei *P. aeruginosa* zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Antibiotika und Wasserstoffperoxid (Nguyen *et al.*, 2011; Khakimova *et al.*, 2013). Bei dieser Mutante wurde eine verringerte Katalase- sowie Superoxiddismutase-Aktivität nachgewiesen (Nguyen *et al.*, 2011). Des Weiteren zeigten Khakimova und Kollegen, dass die SR das Expressionslevel von den Katalasegenen *katA* und *katB* reguliert (Khakimova *et al.*, 2013). Damit handelt es sich bei SR um eine Komponente des regulativen Netzwerkes, welche einen Schutz gegenüber oxidativen Stress vermittelt. Damit würde die SR eine weitere Verbindung zwischen oxidativem Stress und antimikrobieller Resistenz darstellen (Poole, 2012a/b).

Die Kombination aus Ciprofloxacin und Tellurit bewirkte bei *P. aeruginosa* PAO1 vor allem eine verminderte Expression von Genen, welche für Komponenten der Proteinbiosynthese kodieren. Davon kodieren fünfzehn Gene für Proteine der ribosomalen 30S-Untereinheit (*rps*-Gene), acht Gene für Proteine der ribosomalen 50S-Untereinheit (*rpm*-Gene) sowie neunzehn Gene für L-Proteine der ribosomalen 50S-Untereinheit (*rpl*-Gene) (siehe Tabelle 27). Weitere vier Gene kodieren für Elongationsfaktoren (*tufA*, *tufB*, *fusA1*, *tsf*) und ein Gen kodiert für einen translationalen Initiationsfaktor (*infC*) (siehe Tabelle 27). Eine Beeinflussung der ribosomalen Biogenese wiesen auch Palma und Kollegen im Transkriptom von *P. aeruginosa* in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid nach (Palma *et al.*, 2004). Eine verminderte Expression von Genen, welche für Proteine der ribosomalen 30S- und 50S-Untereinheit kodieren (*rps*-, *rpl*-, *rpm*-Gene), konnte ebenfalls bei *E. coli* in Anwesenheit der nitroaromatischen Verbindung para-Nitrophenol detektiert werden (Brown *et al.*, 2008). Des Weiteren wurde bei gegenüber Metallionen toleranten *E.coli*-Stämmen eine verringerte Expression von Genen, die für Komponenten der Translation kodieren, nachgewiesen (Brocklehurst & Morby, 2000). Dabei wurde vermutet, dass die bei zunehmender Konzentration des Toxikums beobachtete graduelle Abnahme der Expressionsraten von Genen, die für Komponenten der Translation kodieren, entweder eine spezifische zelluläre Stressantwort darstellt oder auf einer niedrigeren Wachstumsrate in Anwesenheit einer erhöhten Konzentrationen des jeweiligen Toxikums basiert

(Brocklehurst & Morby, 2000; Brown *et al.*, 2008). Da die RNA-Isolierung zu definierten Zeitpunkten innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase erfolgte (siehe Kapitel 2.2.3.4), kann ein Einfluss der Wachstumsrate auf die Expressionsraten von Genen, die für Komponenten der Translation kodieren, ausgeschlossen werden. Würde die gesteigerte Expression von für tRNAs kodierenden Genen zu einer erhöhten Menge an nicht beladenen tRNAs in der Zelle führen, könnte die damit verbundene SR-Aktivierung als eine zelluläre Stressantwort für die verminderte Expression von Genen, die für Komponenten der Translation kodieren, ursächlich sein.

Bezogen auf die Expressionsrate von für Komponenten der Translation kodierenden Genen ist das Expressionsmuster in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (Palma *et al.*, 2004) mit dem in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit vergleichbar. Damit scheint die in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit verringerte Expression von Genen, die für Komponenten der Translation kodieren, ein Hinweis auf eine erhöhte ROS-Menge zu sein. Des Weiteren bewirkte die Kombination aus Ciprofloxacin und Tellurit eine verminderte Expression von Genen, die für Komponenten des Metabolismus kodieren (siehe Tabelle 27). Dazu gehören neben *atpH* (PA5557, ATPase δ -Kette), *acpP* (PA2966, Acyl-Carrier-Protein) sowie PA2323 (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) auch *sucC* (PA1588) und *sucD* (PA1589). Die Gene *sucC* und *sucD* kodieren für die beta- bzw. alpha-Untereinheit der Succinyl-CoA-Synthetase. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von Succinyl-CoA zu Succinat innerhalb des Tricarbonsäurezyklus (Bott, 2007; Kern *et al.*, 2007). In diesem Zusammenhang wurde beschrieben, dass in Abhängigkeit von der Umweltbedingung eine Modulierung des Tricarbonsäurezyklus erfolgt (Hamel & Appanna, 2001; Mailloux *et al.*, 2007), wobei dieser Stoffwechselweg eine entscheidende Funktion bei der Detoxifizierung von ROS einnimmt (Mailloux *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2007, 2008, 2009). Um weitere Aussagen über eine mögliche Tellurit-vermittelte metabolische Adaptation treffen zu können, wurde der zentrale Kohlenstoffwechsel von *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin sowie Ciprofloxacin und Tellurit untersucht.

3.6.2 Charakterisierung des zentralen Kohlenstoffwechsels von *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit

Zur Charakterisierung der *in vivo*-Enzymaktivitäten und intrazellulären Stoffwechselreaktionen des zentralen Kohlenstoffwechsels von *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin als auch von Ciprofloxacin und Tellurit wurde ein [1-¹³C]-Glukoseminimalmedium verwendet (Berger *et al.*, 2014). Das markierte Substrat eignet sich zur Analyse der Stoffwechselverteilung des Pentosephosphatwegs (PPP), des Entner-Doudoroff-Stoffwechselwegs (EDP), des Embden-Meyerhof-Parnas-Stoffwechselweg (EMPP), des Tricarbonsäure-Zyklus (TCA-Zyklus), des Glyoxylatshunts (Gly-Shunt) sowie der anaplerotischen Flüsse. Während der Kultivierung der Zellen erfolgt die Metabolisierung des Substrats [1-¹³C]-Glukose über den zentralen Kohlenstoffwechsel. Dadurch wird der markierte Kohlenstoff in den Metaboliten verteilt. Für die Untersuchung der Markierungsanreicherung sowie Berechnung der metabolischen Flussverteilung wurden proteinogene Aminosäuren verwendet. Die Vorläufermoleküle dieser Aminosäuren stammen aus bestimmten Bereichen des zentralen Kohlenstoffwechsels. Voraussetzung für diese Analysevariante ist, dass sich der Metabolismus des zu untersuchenden Mikroorganismus in einem metabolischen sowie einem isotopischen stationären Zustand befindet (siehe Tabelle 29 sowie Abbildung 16 und 17). Die Bestimmung der Markierungsdaten von den Aminosäuren erfolgte mittels der gekoppelten Gaschromatographie/Massenspektrometrie (Wittmann & Heinzle, 2002; Wittmann, 2007). Die *in vivo*-Kohlenstoffflussverteilung des zentralen Kohlenstoffwechsels von *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin ist in Abbildung 14 dargestellt. Die Abbildung 15 zeigt die *in vivo*-Kohlenstoffflussverteilung des zentralen Stoffwechsels von *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit. Die *in vivo*-Kohlenstoffflussverteilung des zentralen Kohlenstoffwechsels von *P. aeruginosa* PAO1 in Abwesenheit von Zusätzen (Standardbedingung) ist in der Publikation von Berger und Kollegen dargestellt (Berger *et al.*, 2014).

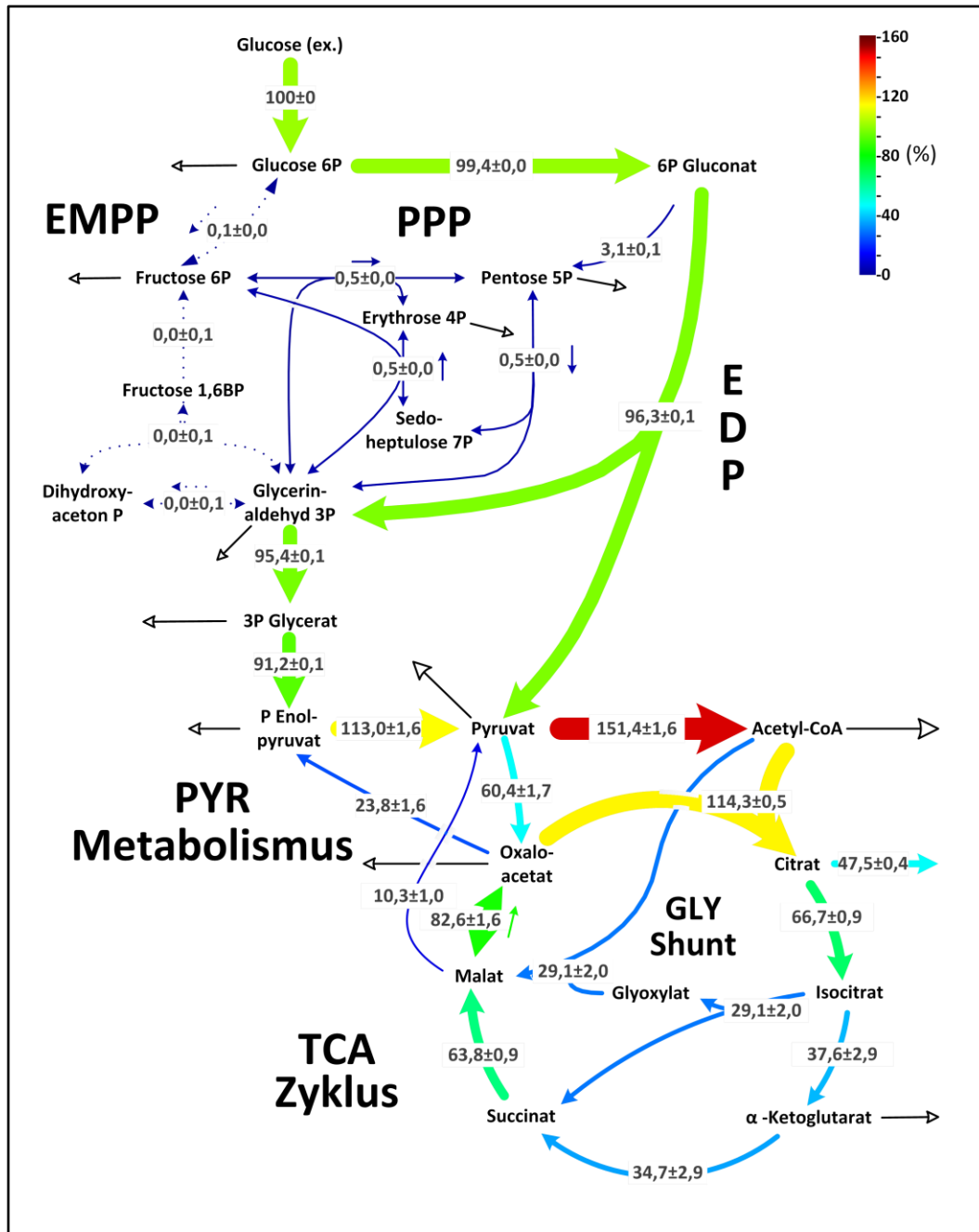


Abbildung 14: *In vivo*-Kohlenstoffflussverteilung des zentralen Stoffwechsels von *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin kultiviert in $[1-^{13}\text{C}]$ -Glukoseminimalmedium. Die Flüsse stellen die molaren Prozente der spezifischen Substrataufnahmerate dar. Die offenen Pfeile stehen für Flüsse in Richtung Biomasseproduktion. Für reversible Reaktionen wurde der Nettofluss angegeben und durch Pfeile gekennzeichnet. Für die durchschnittlichen Flüsse wurde eine Standardabweichung angegeben. PPP: Pentosephosphatweg, EDP: Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg, EMPP: Embden-Meyerhof-Parnas-Stoffwechselweg, PYR-Metabolismus: Pyruvat-Metabolismus, Gly-Shunt: Glyoxylat-Shunt und TCA-Zyklus: Tricarbonsäure-Zyklus.

Die Flüsse im oberen Teil des zentralen Kohlenstoffwechsels, zu dem der Pentosephosphatweg (PPP) sowie der Embden-Meyerhof-Parnas- (EMPP) und Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg (EDP) zählen, wiesen zwischen den getesteten Bedingungen kaum Differenzen auf. Sowohl in Anwesenheit von Ciprofloxacin als auch von Ciprofloxacin und Tellurit war der EMPP inaktiv. Eine mögliche Ursache könnte die bei *P. aeruginosa* PAO1 nachgewiesene fehlende Aktivität der Phosphofructokinase sein (Berger *et al.*, 2014). Dieses Enzym katalysiert im EMPP die Reaktion von Fructose-6-phosphat zu Fructose-1,6-bisphosphat (Fuhrer *et al.*, 2005; Blank *et al.*, 2008). Die nicht vollständige enzymatische Ausstattung für den EMPP ist auch für *P. putida* und *P. fluorescens* beschrieben worden (Martins dos Santos *et al.*, 2004; Silby *et al.*, 2009). Die Flussraten im PPP waren in beiden Bedingungen gering. *P. aeruginosa* PAO1 katabolisierte Glukose sowohl in Anwesenheit von Ciprofloxacin als auch in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit bevorzugt über den EDP. Des Weiteren konnte bei beiden Bedingungen ein Ausschleusen des Intermediates Citrat aus dem Tricarbonsäure-Zyklus (TCA-Zyklus) beobachtet werden.

Im unteren Teil des zentralen Kohlenstoffwechsels, der den Pyruvatmetabolismus (Pyr-Metabolismus), den TCA-Zyklus, die anaplerotischen Reaktionen sowie den Glyoxylat-Shunt (Gly-Shunt) umfasst, konnte bei *P. aeruginosa* PAO1 zwischen den getesteten Bedingungen eine hohe Varianz detektiert werden. Dabei traten besonders große Unterschiede in der Flussverteilung im TCA-Zyklus sowie im Gly-Shunt auf. In Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit konnte eine deutlich niedrigere Aktivität für die Isocitratdehydrogenase nachgewiesen werden. *P. aeruginosa* ist eines der wenigen Bakterien, welches über zwei für die Isocitratdehydrogenase kodierende Gene (*icd* und *idh*) verfügt (Banerjee *et al.*, 2005; Maki *et al.*, 2006 Chung *et al.*, 2013). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Isoenzyme Icd und Idh von *P. aeruginosa* NADP⁺-abhängig sind (Eichner, 2012). Die NADP⁺-abhängige Isocitratdehydrogenase katalysiert die Umsetzung von Isocitrat zu alpha-Ketoglutarat bei gleichzeitiger Reduktion von NADP⁺ zu NADPH (Matsuo *et al.*, 2010). Damit ist die Isocitratdehydrogenase von *P. aeruginosa* an der Produktion vom Co-Faktor NADPH beteiligt. Mittels Transkriptomanalyse konnte eine verminderte Expression von den Genen *icd* (PA2623) und *idh* (PA2624) in Anwesenheit

von Ciprofloxacin als auch in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit detektiert werden. Die Veränderung der Transkriptmenge war nicht signifikant. Bezogen auf die Expressionsrate von den Genen *icd* und *idh* konnte zwischen den getesteten Bedingungen ein geringfügiger Unterschied beobachtet werden, wobei die differentielle Regulation diese Gene in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit etwas stärker ausfiel (siehe Tabelle 25). Des Weiteren konnte in Anwesenheit von Tellurit und Ciprofloxacin keine Aktivität für die alpha-Ketoglutarat-Dehydrogenase sowie Succinyl-CoA-Synthetase nachgewiesen werden. Ersteres Enzym katalysiert die Umsetzung von alpha-Ketoglutarat zu Succinyl-CoA, welches anschließend durch die Succinyl-CoA-Synthetase zu Succinat umgesetzt wird (Joyce *et al.*, 2000; Tretter & Adam-Vizi, 2005). Mittels Transkriptomanalyse konnte eine verminderte Expression von den Genen *sucA* (PA1585) und *sucB* (PA1586) in Anwesenheit von Ciprofloxacin als auch in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit detektiert werden. Diese Gene kodieren für Komponenten des alpha-Ketoglutarat-Komplexes. Die Veränderung der Transkriptmenge war nicht signifikant (siehe Tabelle 25). Zudem konnte eine verminderte Expressionsrate von den Genen *sucC* (PA1588) und *sucD* (PA1589), welche für die beta- bzw. alpha-Untereinheit der Succinyl-CoA-Synthetase kodieren, in Anwesenheit von Ciprofloxacin als auch in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit nachgewiesen werden. In Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit konnte eine signifikante Veränderung der Transkriptmenge beobachtet werden (siehe Tabelle 25). In diesem Zusammenhang wurde beschrieben, dass die von Fur kontrollierten sRNAs PrrF1 und PrrF2 einen regulatorischen Einfluss auf Komponenten des zentralen Kohlenstoffwechsels besitzen (Farrow & Pesci, 2007; Vasil, 2007; Cornelis *et al.*, 2009). Damit verbinden sie den Eisenmetabolismus und zentralen Kohlenstoffwechsel miteinander (Sonnleitner & Haas, 2011). In Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit konnte eine gesteigerte Expression von den Genen *prfF1* und *prfF2* nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.6.2). Somit könnte die Tellurit-vermittelte Induktion der Expression von diesen Genen für die beobachteten metabolischen Veränderungen ursächlich sein.

Dagegen führte die Kombination aus Ciprofloxacin und Tellurit bei *P. aeruginosa* PAO1 zu erhöhten Flüssen innerhalb des Glyoxylatstoffwechsels. Hierbei handelt es sich um einen Nebenweg des TCA-Zyklus, der die Enzyme Isocitratlyase (ICL) und Malatsynthase

(MS) umfasst. Die ICL katalysiert die Spaltung von Isocitrat in Succinat und Glyoxylat. Die MS katalysiert die Kondensation von Glyoxylat und Acetyl-CoA unter Bildung von Malat (Kretzschmar *et al.*, 2008). Die in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit beobachtete Steigerung des Glyoxylatstoffwechsels könnte eine Möglichkeit sein, um minimales Wachstum bei einer verringerten Aktivität des TCA-Zyklus zu garantieren.

Eine Veränderung des zentralen Kohlenstoffwechsels als Reaktion auf bestimmte Substanzen konnte auch in anderen Studien nachgewiesen werden. In Anwesenheit von Tellurit detektierten Reinoso und Kollegen bei *E.coli* eine reduzierte Aktivität des alpha-Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes (KGDHk) sowie einen damit verbunden erhöhten alpha-Ketoglutarat-Gehalt (Reinoso *et al.*, 2012). Des Weiteren beobachteten sie, dass bei einem *E.coli*-Stamm mit einer beeinträchtigten KGDHk-Aktivität verglichen mit dem Wildtyp weniger ROS vorhanden waren (Reinoso *et al.*, 2012). Da alpha-Ketoglutarat Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen durch spontane Decarboxylierung detoxifizieren kann (Fedotcheva *et al.*, 2006), wurde vermutet, dass es sich bei der Reduktion der KGDHk-Aktivität um eine zellulären Strategie zur ROS-Detoxifizierung handelt (Mailloux *et al.*, 2007; Reinoso *et al.*, 2012). Bei *P. fluorescens* wurde eine Aluminium-induzierte Modifikation des TCA-Zyklus beschrieben (Hamel & Appanna, 2001; Singh *et al.*, 2009). Durch eine veränderte Aktivität von bestimmten Enzymen des TCA-Zyklus wird die Generierung von Oxalacetat, welches Aluminium bindet, bewirkt (Singh *et al.*, 2009). Des Weiteren konnte bei *E. coli* in Anwesenheit von Tellurit auch eine Beeinflussung des PP-Stoffwechselwegs nachgewiesen werden (Sandoval *et al.*, 2011). In Anwesenheit von Tellurit wurde eine gesteigerte Transkriptionsrate des für die Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase kodierenden Gens *zwf* detektiert (Sandoval *et al.*, 2011). Außerdem zeigten Sandoval und Kollegen, dass sich bei *E. coli* in Anwesenheit von Tellurit der NADPH-Gehalt erhöht während sich die NADH-Konzentration um die Hälfte reduziert (Sandoval *et al.*, 2011). In diesem Zusammenhang zeigten Singh und Kollegen, dass oxidativer Stress eine metabolische Adaptation induziert, welche eine erhöhte NADPH-Synthese sowie eine verringerte NADH-Produktion bewirkt (Singh *et al.*, 2007). Das überwiegend im TCA-Zyklus produzierte NADH wird für die Synthese von ATP mittels oxidativer Phosphorylierung benötigt (Mailloux *et al.*, 2007). Aberrierende Elektronenflüsse innerhalb

der Elektronentransportkette führen zur Produktion von ROS (Salunkhe *et al.*, 2008; Imlay, 2013). Folglich verfügen aerob lebende Bakterien über Strategien zur Detoxifizierung von ROS (Fones *et al.*, 2011; Lushack 2001, 2011). Die daran beteiligten Komponenten wie die Katalase, die Superoxiddismutase und die Glutathionperoxidase sind zur Erfüllung ihre biologischen Funktion auf NADPH angewiesen (Mailloux *et al.*, 2007). Chavarina und Kollegen zeigten, dass die komplette enzymatische Ausstattung für den EMPP bei *P. putida* zu einer verringerten Sensitivität gegenüber oxidativen Stress führt (Chavarría *et al.*, 2013). Im Gegensatz zum EMPP wird durch den EDP das für antioxidative Abwehrmechanismen benötigte NADPH zur Verfügung gestellt (Singh *et al.*, 2007; Chavarría *et al.*, 2013). Damit ist die Balance zwischen dem NADPH- und NADH-Gehalt essentiell für aerob lebende Bakterien (Singh *et al.*, 2007). In Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit nimmt die Produktion von NADPH ab. Somit würde weniger NADPH für die Detoxifizierung von ROS zur Verfügung stehen, was wiederum zu einer erhöhten ROS-Menge führen könnte. Dieser Zusammenhang würde die in dieser Arbeit nachgewiesene erhöhte ROS-Menge in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit erklären (siehe Kapitel 3.5). Damit scheint die Kombination aus Ciprofloxacin und Tellurit die Balance zwischen dem NADPH- und NADH-Gehalt zu stören. Somit wäre die auf einer metabolischen Beeinflussung basierende verringerte NADPH-Produktion ursächlich für den in dieser Arbeit beobachteten Antibiotika-verstärkenden Effekt von Tellurit (siehe Kapitel 3.2).

4 Zusammenfassung

P. aeruginosa ist einer der häufigsten Erreger von komplizierten Harnwegsinfektionen. Dabei wird die Behandlung von *P. aeruginosa*-bedingten Infektionen besonders durch die hohe intrinsische Resistenz dieses Mikroorganismus erschwert.

Die Genome der uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate MH19, MH27, MH38 und RN21 enthielten Gene, welche in den Referenzgenomen nicht identifiziert werden konnten. Dabei wurden Gene, so genannte Singletons, welche mit einer Resistenz gegenüber Schwermetallen in Verbindung gebracht werden konnten, genauer analysiert. Es wurde gezeigt, dass die uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate unterschiedlich sensitiv auf die getesteten Schwermetalle reagierten. Ein Zusammenhang zwischen den Singletons und der Sensitivität konnte nicht beobachtet werden.

Um Grundlagen für neue therapeutische Strategien zu schaffen, wurde die Verabreichung von Antibiotika in Kombination mit Tellurit untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass die uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate MH19, MH27, MH38 und RN21 sowie der Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Tellurit sensibler auf die Antibiotika Ceftazidim, Ciprofloxacin und Tobramycin reagierten. Dabei entspricht das Wirkprinzip von Tellurit dem von antibiotischen Adjuvantien. Die wirksamen Telluritkonzentrationen waren nicht toxisch für eukaryotische Epithelzellen ECV304. Zur genaueren Untersuchung des Antibiotika-verstärkenden Effekts von Tellurit wurden die intrazelluläre Menge an reaktiven Sauerstoffspezies, das Transkriptionsprofil und der zentrale Kohlenstoffwechsel betrachtet. In Anwesenheit von Ciprofloxacin bzw. Tobramycin und Tellurit konnte bei den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten und dem Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 eine erhöhte ROS-Menge nachgewiesen werden. Die Kombination aus Ciprofloxacin und Tellurit führte bei dem Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 zur Veränderung des Transkriptionsprofils sowie zu einer veränderten Flussverteilung innerhalb des Tricarbonsäure-Zyklus und des Glyoxylat-Shunts.

Die Arbeit trägt zum Verständnis des Antibiotika-verstärkenden Effekts von Tellurit bei und zeigt eine neue therapeutische Strategie bei *P. aeruginosa*-bedingten Infektionen auf.

5 Ausblick

Bei den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten und dem Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 wird die Wirksamkeit der Antibiotika unterschiedlich stark durch Tellurit beeinflusst. Dazu sollten in weiterführenden Experimenten das Transkriptionsprofil und der zentralen Kohlenstoffwechsel in Anwesenheit von Tellurit und den getesteten Antibiotika untersucht werden. Zusätzlich könnten durch diese Experimente weitere Kenntnisse über den Antibiotika-verstärkenden Effekt von Tellurit gewonnen werden. Außerdem würden überprüft werden, ob die in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit bei *P. aeruginosa* PAO1 beobachteten Veränderungen bezüglich des Transkriptionsprofils und des zentralen Kohlenstoffwechsels auf einem generellen Mechanismus basieren. Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse sollten zusätzlich durch die Untersuchung der Genexpression mittels quantitativer PCR verifiziert werden. Dabei sollte ein Schwerpunkt auf Genen liegen, die für Komponenten des Tricarbonsäurezyklus und der „stringent response“ kodieren. Eine Analyse des NAD(P)H-Gehalts in Anwesenheit von Antibiotika und/oder Tellurit ist erforderlich, um die durch die Fluxomanalyse gewonnen Erkenntnisse zu bestätigen. Der Antibiotika-verstärkende Effekt von Tellurit könnte auch bei Therapie von *P. aeruginosa*-bedingten CAUTIs vorteilhaft sein. Vorstellbar ist die Verwendung von telluritbeschichteten Blasenkathetern. Dazu sollte der Einfluss von Tellurit auf das Biofilmwachstum von *P. aeruginosa* untersucht werden. Hierfür könnte in initialen Experimenten mittels Durchflusszelle und konfokalen Laser Scanning Mikroskopie die Entwicklung eines Biofilm auf mit Tellurit-beschichteten Glassoberflächen untersucht werden. Zusätzlich sollte die Wirkung von Tellurit auf weitere eukaryotische Zelllinien überprüft werden, wobei eine längere Inkubationszeit gewählt werden sollte.

Die in den Genomen der uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolate MH19, MH27, MH38 und RN21 identifizierten Singletons sollten in weiterführenden Experimenten genauer untersucht werden, um deren Funktion sowie die Bedeutung für die *P. aeruginosa*-Isolate zu ermitteln.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des menschlichen Harntrakts.....	1
Abbildung 2: Zellgebundene und extrazelluläre Virulenzfaktoren von <i>P. aeruginosa</i>	5
Abbildung 3: Enzymatische Inaktivierung von reaktiven Sauerstoffspezies und Fenton-Reaktion.	18
Abbildung 4: Einfluss von Tellurit auf die Sensitivität von den uropathogenen <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten MH19, MH27, MH38 und RN21 sowie von dem Laborstamm <i>P. aeruginosa</i> PAO1 gegenüber Ceftazidim.....	50
Abbildung 5: Einfluss von Tellurit auf die Sensitivität von den uropathogenen <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten MH19, MH27 und RN21 sowie von dem Laborstamm <i>P. aeruginosa</i> PAO1 gegenüber Ciprofloxacin..	52
Abbildung 6: Einfluss von Tellurit auf die Sensitivität von den uropathogenen <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten MH19, MH27, MH38 und RN21 sowie von dem Laborstamm <i>P. aeruginosa</i> PAO1 gegenüber Tobramycin..	54
Abbildung 7: Einfluss der Telluritkonzentration auf die Sensitivität des uropathogenen <i>P. aeruginosa</i> -Isolats RN21 gegenüber Ciprofloxacin..	60
Abbildung 8: Einfluss der Telluritkonzentration auf die Sensitivität des uropathogenen <i>P. aeruginosa</i> -Isolats RN21 gegenüber Tobramycin.....	61
Abbildung 9: Überlebensrate von Epithelzellen (ECV304) nach der Inkubation für 2, 4 und 8 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Tellurit.....	64
Abbildung 10: Die intrazelluläre ROS-Menge, ausgedrückt in relative Lichteinheiten (RLE) pro $1 \cdot 10^6$ Zellen, von dem uropathogenen <i>P. aeruginosa</i> -Isolat MH27 in Anwesenheit des einfachen MIC-Wertes von Ciprofloxacin und/oder von Tellurit in 1:10 LB.....	70
Abbildung 11: Die intrazelluläre ROS-Menge, ausgedrückt in relative Lichteinheiten (RLE) pro $1 \cdot 10^6$ Zellen, von dem uropathogenen <i>P. aeruginosa</i> -Isolat MH27 in Anwesenheit des einfachen MIC-Wertes von Tobramycin und/oder von Tellurit in 1:10 LB.....	72
Abbildung 12: Transkriptionsprofil von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin im Vergleich zum Standard..	79
Abbildung 13: Transkriptionsprofil von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit im Vergleich zum Standard.	80
Abbildung 14: <i>In vivo</i> -Kohlenstoffflussverteilung des zentralen Stoffwechsels von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin kultiviert in $[1-^{13}\text{C}]$ -Glukoseminimalmedium	90

Abbildung 15: <i>In vivo</i> -Kohlenstoffflussverteilung des zentralen Stoffwechsels von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit kultiviert in [1- ¹³ C]-Glukoseminimalmedium.....	91
Abbildung 16: Metabolisches Profil der verbrachten Glukosekonzentration und der gebildeten Trockenmasse von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin..	151
Abbildung 17: Metabolisches Profil der verbrachten Glukosekonzentration und der gebildeten Trockenmasse von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit.....	151

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte.....	20
Tabelle 2: Spezielle Materialien und kommerzielle Kits	22
Tabelle 3: Verwendeten Chemikalien	23
Tabelle 4: Eingesetztes Enzym und die verwendeten Antibiotika	23
Tabelle 5: Verwendeten Medien sowie ihre Zusammensetzung.....	24
Tabelle 6: Verwendeten Lösungen sowie ihre Zusammensetzung	25
Tabelle 7: Verwendeten Medien und Lösungen für zellbiologische Experimente	26
Tabelle 8: Beschreibung der verwendeten <i>P. aeruginosa</i> -Stämme.....	26
Tabelle 9: Verwendeten Konzentrationen von Tellurit und Ciprofloxacin.....	28
Tabelle 10: Verwendeten Konzentrationen von Tellurit.....	30
Tabelle 11: Verwendeten Antibiotikakonzentrationen.....	30
Tabelle 12: Verwendete Zelllinie	31
Tabelle 13: Die eingesetzten einfachen MIC-Werte von Tellurit	35
Tabelle 14: Die eingesetzten einfachen MIC-Werte von den Antibiotika	35
Tabelle 15: Genomische Eigenschaften von den uropathogenen <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten MH19, MH27, MH38 und RN21 sowie Gene, welche mit einer Resistenz gegenüber bestimmten Schwermetallen sowie mit Tellurit in Verbindung gebracht werden können. .	42
Tabelle 16: Sensitivität von den uropathogenen <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten MH19, MH27, MH38 und RN21 sowie von dem Laborstamm <i>P. aeruginosa</i> PAO1 gegenüber bestimmten Schwermetallen und Tellurit.....	46
Tabelle 17: Die Tellurit-vermittelte Steigerung der Antibiotikawirksamkeit bei den uropathogenen <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten MH19, MH27, MH38 und RN21 sowie bei dem Laborstamm <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	56
Tabelle 18: Die intrazelluläre ROS-Menge, ausgedrückt in relative Lichteinheiten (RLE) pro $1 \cdot 10^6$ Zellen, von den uropathogenen <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten MH19, MH27, MH38 und RN21 sowie von dem Laborstamm <i>P. aeruginosa</i> PAO1 in Anwesenheit des einfachen MIC-Wertes von Ciprofloxacin und/oder von Tellurit in 1:10 LB.....	69
Tabelle 19: Die intrazelluläre ROS-Menge, ausgedrückt in relative Lichteinheiten (RLE) pro $1 \cdot 10^6$ Zellen, von den uropathogenen <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten MH19, MH27, MH38 und RN21 sowie von dem Laborstamm <i>P. aeruginosa</i> PAO1 in Anwesenheit des einfachen MIC-Wertes von Tobramycin und/oder von Tellurit in 1:10 LB.	71
Tabelle 20: Übereinstimmung zwischen dem Transkriptionsprofil von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin sowie von Ciprofloxacin und Tellurit im Vergleich zum Standard.	82
Tabelle 21: Differentiell regulierten Gene von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit im Vergleich zum Standard..	86

Tabelle 22: Sensitivität von den uropathogenen <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten MH27, MH38 und RN21 sowie von dem Laborstamm <i>P. aeruginosa</i> PAO1 gegenüber Ceftazidim, Ciprofloxacin und Tobramycin.....	131
Tabelle 23: Singletons von den uropathogenen <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten MH19, MH27, MH38 und RN21, die mit einer Resistenz gegenüber bestimmten Schwermetallen sowie Tellurit in Verbindung gebracht werden können.	132
Tabelle 24: Das Transkriptionsprofil von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin im Vergleich zum Standard..	134
Tabelle 25: Das Transkriptionsprofil von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit im Vergleich zum Standard.	138
Tabelle 26: Übereinstimmung zwischen dem Transkriptionsprofil von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin und von Ciprofloxacin und Tellurit im Vergleich zum Standard.....	143
Tabelle 27: Differentiell regulierte Gene von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin.....	145
Tabelle 28: Differentiell regulierte Gene von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit.	148
Tabelle 29: Isotopisch stationäre Zustände von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin bzw. Ciprofloxacin und Tellurit.....	152

8 Literaturverzeichnis

- Abedini, F., Ahmadi, A., Yavari, A., Hosseini, V., & Mousavi, S. (2013). Comparison of silver nylon wound dressing and silver sulfadiazine in partial burn wound therapy. *Int Wound J.*, 10: 573–8.
- Abuja, P. M., & Albertini, R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*, 306: 1–17.
- Aktories, K., & Barbieri, J. T. (2005). Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat Rev Microbiol*, 3: 397–410.
- Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53: 1565–74.
- Alekhina, O., Valkovicova, L., & Turna, J. (2011). Study of membrane attachment and in vivo co-localization of TerB protein from uropathogenic *Escherichia coli* KL53. *Gen Physiol Biophys*, 30: 286–292.
- Almeida, A. M., Bertoncini, C. R., Borecký, J., Souza-Pinto, N. C., & Vercesi, A. E. (2006). Mitochondrial DNA damage associated with lipid peroxidation of the mitochondrial membrane induced by Fe²⁺-citrate. *An Acad Bras Cienc*, 78: 505–14.
- Alvarez-Ortega, C., Wiegand, I., Olivares, J., Hancock, R. E., & Martínez, J. L. (2010). Genetic determinants involved in the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 54: 4159–67.
- Anjem, A., Varghese, S., & Imlay, J. A. (2009). Manganese import is a key element of the OxyR response to hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 72: 844–58.
- Atiyeh, B. S., Costagliola, M., Hayek, S. N., & Dibo, S. A. (2007). Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *Burns.*, 33: 139–48.
- Avent, M. L., Rogers, B. A., Cheng, A. C., & Paterson, D. L. (2011). Current use of aminoglycosides: indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity. *Intern Med J*, 41: 441–9.
- Baker-Austin, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R., & McArthur, J. V. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol*, 14: 176–82.

- Banerjee, S., Nandyala, A., Podili, R., Katoch, V. M., & Hasnain, S. E. (2005). Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate dehydrogenases (ICD-1 and ICD-2) reveals differences in coenzyme affinity, oligomeric state, pH tolerance and phylogenetic affiliation. *BMC Biochem*, 6:20.
- Banin, E., Lozinski, A., Brady, K. M., Berenshtein, E., Butterfield, P. W., Moshe, M., Chevion, M., Greenberg, E. P., & Banin, E. (2008). The potential of desferrioxamine-gallium as an anti-*Pseudomonas* therapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 16761–6.
- Barkay, T., Miller, S. M., & Summers, A. O. (2003). Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol Rev*, 27: 355–84.
- Barnes, A. I., Herrero, I. L., & Albesa, I. (2005). New aspect of the synergistic antibacterial action of ampicillin and gentamicin. *Int J Antimicrob Agents*, 26: 146–51.
- Bayir, H. (2005). Reactive oxygen species. *Crit care Med*, 38: 498-501.
- Beattie, M., & Taylor, J. (2011). Silver alloy vs. uncoated urinary catheters: a systematic review of the literature. *J Clin Nurs*, 20: 2098–108.
- Becerra, M. C., & Albesa, I. (2002). Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 297: 1003–7.
- Berger, A., Dohnt, K., Tielen, P., Jahn, D., Becker, J., & Wittmann, C. (2014). Robustness and plasticity of metabolic pathway flux among uropathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS One*, 9:4.
- Berger, A. (2014). Metabolische Netzwerkanalyse uropathogener *Pseudomonas aeruginosa*-Isolate. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Bernal, P., Molina-Santiago, C., Daddaoua, A., & Llamas, M. A. (2013). Antibiotic adjuvants: identification and clinical use. *Microb Biotechnol*, 6: 445–9.
- Bielaszewska, M., Tarr, P. I., Karch, H., Zhang, W., & Mathys, W. (2005). Phenotypic and molecular analysis of tellurite resistance among enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and sorbitol-fermenting O157:NM clinical isolates. *J Clin Microbiol*, 43: 452–4.
- Bienert, G. P., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P. (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta*, 1758: 994–1003.

- Blank, L. M., Ionidis, G., Ebert, B. E., Bühler, B., & Schmid, A. (2008). Metabolic response of *Pseudomonas putida* during redox biocatalysis in the presence of a second octanol phase. *FEBS J*, 275: 5173–90.
- Blondeau, J. M. (2004). Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Surv Ophthalmol*, 49: 73–8.
- Boes, N., Schreiber, K., & Schobert, M. (2008). SpoT-triggered stringent response controls *usp* gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 190: 7189–99.
- Bogdan, C., Röllinghoff, M., & Diefenbach, A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol*, 12: 64–76.
- Bott, M. (2007). Offering surprises: TCA cycle regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *Trends Microbiol*, 15: 417–25.
- Brazas, M. D., & Hancock, R. E. (2005). Ciprofloxacin induction of a susceptibility determinant in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 3222–7.
- Breidenstein, E. B., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol*, 19: 419–26.
- Breidenstein, E. B., Khaira, B. K., Wiegand, I., Overhage, J., & Hancock, R. E. (2008). Complex ciprofloxacin resistome revealed by screening a *Pseudomonas aeruginosa* mutant library for altered susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*, 52: 4486–91.
- Brocklehurst, K. R., & Morby, A. P. (2000). Metal-ion tolerance in *Escherichia coli*: analysis of transcriptional profiles by gene-array technology. *Microbiology*, 146: 2277–82.
- Brooks, T., & Keevil, C. W. (1997). A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. *Lett Appl Microbiol*, 24: 203–6.
- Brown, A., Snape, J. R., Harwood, C. R., & Head, I. M. (2008). Whole genome microarray analysis of the expression profile of *Escherichia coli* in response to exposure to para-nitrophenol. *Adv Exp Biol*, 02: 221–48.
- Brown, D. F., Edwards, D. I., Hawkey, P. M., Morrison, D., Ridgway, G. L., Towner, K. J., & Wren, M. W. (2005). Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother*, 56: 1000–18.

- Bucior, I., Pielage, J. F., & Engel, J. N. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium. *PLoS Pathog*, 8: e1002616.
- Buonocore, G., Perrone, S., & Tataranno, M. L. (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med*, 15: 186–90.
- Burd, A., Kwok, C. H., Hung, S. C., Chan, H. S., Gu, H., Lam, W. K., & Huang, L. (2007). A comparative study of the cytotoxicity of silver-based dressings in monolayer cell, tissue explant, and animal models. *Wound Repair Regen.*, 15: 94–104.
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2009). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 54: 969–76.
- Cabiscol, E., Tamarit, J., & Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol*, 3: 3–8.
- Caille, O., Rossier, C., & Perron, K. (2007). A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 189: 4561–8.
- Calderón, G., Andrea, W., Vargas, B., Mercedes, M., Suárez, B., Alirio, W., & Andrés, L. (2013). Horizontal transfer of heavy metal and antibiotic-resistance markers between indigenous bacteria, colonizing mercury contaminated tailing ponds in southern Venezuela, and human pathogens. *Rev Soc Ven Microbiol*, 33: 110–15.
- Calderón, I. L., Arenas, F. A., Pérez, J. M., Fuentes, D. E., Araya, M. A., Saavedra, C. P., Tantaleán, J. C., Pichuantes, S. E., Youderian, P. A., & Vásquez, C. C. (2006). Catalases are NAD(P)H-dependent tellurite reductases. *PloS One*, 1: e70.
- Calhoun, L. N., & Kwon, Y. M. (2011). Structure, function and regulation of the DNA-binding protein Dps and its role in acid and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*: a review. *J Appl Microbiol*, 110: 375–86.
- Castellano, J. J., Shafii, S. M., Ko, F., Donate, G., Wright, T. E., Mannari, R. J., Payne, W. G., Smith, D. J., & Robson, M. C. (2007). Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *Int Wound J*, 4: 114–22.
- Chang, W., Small, D. A., Toghrol, F., & Bentley, W. E. (2005). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* reveals induction of pyocin genes in response to hydrogen peroxide. *BMC Genomics*, 6: 115.
- Chao, Y., & Fu, D. (2004). Kinetic study of the antiport mechanism of an *Escherichia coli* zinc transporter, ZitB. *J Biol Chem*, 279: 12043–50.

- Chasteen, T. G., Fuentes, D. E., Tantaleán, J. C., & Vásquez, C. C. (2009). Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. *FEMS Microbiol Rev*, 33: 820–32.
- Chavarría, M., Nikel, P. I., Pérez-Pantoja, D., & de Lorenzo, V. (2013). The Entner-Doudoroff pathway empowers *Pseudomonas putida* KT2440 with a high tolerance to oxidative stress. *Environ Microbiol*, 15: 1772–85.
- Chaw, K. C., Manimaran, M., & Tay, F. E. H. (2005). Role of silver ions in destabilization of intermolecular adhesion forces measured by atomic force microscopy in *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 4853–9.
- Cheng, G., Zhang, Z., Chen, S., Bryers, J. D., & Jiang, S. (2007). Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. *Biomaterials*, 28: 4192–9.
- Chien, C. C., Jiang, M. H., Tsai, M. R., & Chien, C. C. (2011). Isolation and characterization of an environmental cadmium- and tellurite-resistant *Pseudomonas* strain. *Environ Toxicol Chem*, 30: 2202–7.
- Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics : mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65: 232–60.
- Choudhury, H. G., Cameron, A. D., Iwata, S., & Beis, K. (2011). Structure and mechanism of the chalcogen-detoxifying protein TehB from *Escherichia coli*. *Biochem J*, 435: 85–91.
- Chung, J. C., Rzhepishevskaya, O., Ramstedt, M., & Welch, M. (2013). Type III secretion system expression in oxygen-limited *Pseudomonas aeruginosa* cultures is stimulated by isocitrate lyase activity. *Open Biol*, 3: 120131.
- Cirz, R. T., Jones, M. B., Gingles, N. A., Minogue, T. D., Jarrahi, B., Peterson, S. N., & Romesberg, F. E. (2007). Complete and SOS-mediated response of *Staphylococcus aureus* to the antibiotic ciprofloxacin. *J Bacteriol*, 189: 531–9.
- Cirz, R. T., O'Neill, B. M., Hammond, J. A., Head, S. R., & Romesberg, F. E. (2006). Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS response and its role in the global response to the antibiotic ciprofloxacin. *J Bacteriol*, 188: 7101–10.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*, 17: 1195–214.
- Coral, G., Arıkan, B., & Coral, M. N. Ü. (2006). A preliminary study on tellurite resistance in *Pseudomonas* spp . isolated from hospital sewage. *Pol J Environ Stud*, 15: 517–20.

- Cornelis, P., Matthijs, S., & Van Oeffelen, L. (2009). Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals*, 22: 15–22.
- Cornelis, P., Wei, Q., Andrews, S. C., & Vinckx, T. (2011). Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Metallomics*, 3: 540–9.
- Corper, H. J. (1915). Sodium tellurite as a rapid test for the viability of tubercle bacilli. *J Infect Dis*, 16: 47–53.
- Cotar, A. I., Chifiriuc, M. C., Dinu, S., Bucur, M., Iordache, C., Banu, O., Dracea, O., Larion, C., & Lazar, V. (2010). Screening of molecular virulence markers in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical infections. *Int J Mol Sci*, 11: 5273–91.
- Dagner-Kahrman, I. (2013). Homöopathisches Jahrbuch 2010 der Clemens von Bönninghausen-Akademie. Books on Demand, 3. Auflage.
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*, 2: 114–22.
- De Bentzmann, S., & Plésiat, P. (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. *Environ Microbiol*, 10: 1655–65.
- De Souza, R. M., & Olsburgh, J. (2008). Urinary tract infection in the renal transplant patient. *Nat Clin Pract Nephrol*, 4: 252–64.
- Deredjian, A., Colinon, C., Brothier, E., Favre-Bonté, S., Cournoyer, B., & Nazaret, S. (2011). Antibiotic and metal resistance among hospital and outdoor strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Res Microbiol*, 162: 689–700.
- Derks, K. W. J., Hoeijmakers, J. H. J., & Pothof, J. (2014). The DNA damage response: the omics era and its impact. *DNA Repair*, 19: 214–20.
- Di Tomaso, G., Fedi, S., Carnevali, M., Manegatti, M., Taddei, C., & Zannoni, D. (2002). The membrane-bound respiratory chain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 cells grown in the presence or absence of potassium tellurite. *Microbiology*, 148: 1699–708.
- Dietrich, L. E., Price-Whelan, A., Petersen, A., Whiteley, M., & Newman, D. K. (2006). The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 61: 1308–21.

- Dimatatac, E. L., Alejandria, M. M., Montalban, C., Pineda, C., Ang, C., & Delino, R. (2003). clinical outcomes and costs of care of antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Microbiol Infect Dis*, 32: 159-67.
- Ding, W. J., Hasegawa, T., Peng, D., Hosaka, H., & Seko, Y. (2002). Preliminary investigation on the cytotoxicity of tellurite to cultured HeLa cells. *J Trace Elem Med Biol*, 16: 99-102.
- Doi, Y., & Arakawa, Y. (2007). 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis*, 45: 88-94.
- Driscoll, J. A., Brody, S. L., & Kollef, M. H. (2007). The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, 67: 351-68.
- Drlica, K., Hiasa, H., Kerns, R., Malik, M., Mustaev, A., & Zhao, X. (2009). Quinolones: action and resistance updated. *Curr Top Med Chem*, 9: 981-98.
- Drlica, K., Malik, M., Kerns, R. J., & Zhao, X. (2008). Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother*, 52: 385-92.
- Duan, Q., Zhou, M., Zhu, L., & Zhu, G. (2011). Flagella and bacterial pathogenicity. *J Basic Microbiol*, 53: 1-8.
- Dunham, S. A., McPherson, C. J., & Miller, A. A. (2010). The relative contribution of efflux and target gene mutations to fluoroquinolone resistance in recent clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 29: 279-88.
- Durand, E., Bernadac, A., Ball, G., Lazdunski, A., Sturgis, J. N., & Filloux, A. (2003). Type II protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: the pseudopilus is a multifibrillar and adhesive structure. *J Bacteriol*, 185: 2749-2758.
- Durfee, T., Hansen, A.-M., Zhi, H., Blattner, F. R., & Jin, D. J. (2008). Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 190: 1084-96.
- Dwyer, D. J., Kohanski, M. A., & Collins, J. J. (2009). Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Curr Opin Microbiol*, 12: 482-9.
- Dwyer, D. J., Kohanski, M. A., Hayete, B., & Collins, J. J. (2007). Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol*, 3:91.
- Dyllick-Brenzinger, M., Liu, M., Winstone, T. L., Taylor, D. E., & Turner, R. J. (2000). The role of cysteine residues in tellurite resistance mediated by the TehAB determinant. *Biochem Biophys Res Commun*, 277: 394-400.

- Efstratiou, A., Engler, K. H., Mazurova, I. K., Glushkevich, T., Vuopio-Varkila, J., & Popovic, T. (2000). Current approaches to the laboratory diagnosis of diphtheria. *J Infect Dis*, 181: S138–45.
- Eichner, A. (2012). Anpassung von *Pseudomonas aeruginosa* an die Mukoviszidose-Lunge. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, München.
- Endimiani, A., Luzzaro, F., Pini, B., Amicosante, G., Rossolini, G. M., & Toniolo, A. Q. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: risk factors and treatment outcome related to expression of the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase. *BMC Infect Dis*, 6: 52.
- Engel, J., & Balachandran, P. (2009). Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol*, 12: 61–6.
- Entner, N., & Doudoroff, M. (1952). Glucose and Gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *J Biol Chem*, 196: 853–62.
- Eschbach, M., Schreiber, K., Trunk, K., Buer, J., Jahn, D., & Schobert, M. (2004). Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *J Bacteriol*, 186: 4596–4604.
- Espírito Santo, C., Taudte, N., Nies, D. H., & Grass, G. (2008). Contribution of copper ion resistance to survival of *Escherichia coli* on metallic copper surfaces. *Appl Environ Microbiol*, 74: 977–86.
- Etienne-Manneville, S., & Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 420: 629–35.
- Faller, A., & Schünke, M. (2008). Der Körper des Menschen: einföhrung in Bau und Funktion. Thieme, 15. komplett überarbeitete Auflage.
- Fan, B., Grass, G., Rensing, C., & Rosen, B. P. (2001). *Escherichia coli* CopA N-terminal Cys(X)(2)Cys motifs are not required for copper resistance or transport. *Biochem Biophys Res Commun*, 286: 414–8.
- Fang, F. C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol*, 2: 820–32.
- Farrow, J. M., & Pesci, E. C. (2007). Two distinct pathways supply anthranilate as a precursor of the *Pseudomonas* quinolone signal. *J Bacteriol*, 189: 3425–33.
- Faulkner, M. J., & Helmann, J. D. (2011). Peroxide stress elicits adaptive changes in bacterial metal ion homeostasis. *Antioxid Redox Signal*, 15: 175–89.

- Fedotcheva, N. I., Sokolov, A. P., & Kondrashova, M. N. (2006). Nonezymatic formation of succinate in mitochondria under oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 41: 56–64.
- Feng, Q., Wu, J., & Chen, G., Cui, F. Z., Kim, T. N., & Kim, J. O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Rev*, 52: 662–8.
- Fernández, L., Gooderham, W. J., Bains, M., McPhee, J. B., Wiegand, I., & Hancock, R. E. (2010). Adaptive resistance to the “last hope” antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. *Antimicrob Agents Chemother*, 54: 3372–82.
- Fernández, L., Jenssen, H., Bains, M., Wiegand, I., Gooderham, J. W., & Hancock, R. E. (2012). The two-component system CprRS senses cationic peptides and triggers adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa* independently of ParRS. *Antimicrob Agents Chemother*, 56: 6212–22.
- Fish, D. N. (2002). Optimal antimicrobial therapy for sepsis. *Am J Health Syst Pharm*, 59: S13–9.
- Fleming, A. (1932). On the specific antimicrobial properties of penicillin and potassium tellurite. Incorporating a method of demonstrating some bacterial antagonisms. *J Pathol Bacteriol*, 35: 831–42.
- Fones, H., & Preston, G. M. (2011). Reactive oxygen and oxidative stress tolerance in plant pathogenic *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol Lett*, 327: 1–8.
- Fothergill, J. L., Mowat, E., Ledson, M. J., Walshaw, M. J., & Winstanley, C. (2010). Fluctuations in phenotypes and genotypes within populations of *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung during pulmonary exacerbations. *J Med Microbiol*, 59: 472–81.
- Foxman, B. (2002). Epidemiology of urinary tract infections: Incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med*, 113: S5–S13.
- Frangipani, E., Slaveykova, V. I., Reimmann, C., & Haas, D. (2008). Adaptation of aerobically growing *Pseudomonas aeruginosa* to copper starvation. *J Bacteriol*, 190: 6706–17.
- Frimmersdorf, E., Horatzek, S., Pelnikevich, A., Wiehlmann, L., & Schomburg, D. (2010). How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. *Environ Microbiol*, 12: 1734–47.

- Fuentes, D. E., Fuentes, E. L., Castro, M. E., Pérez, J. M., Araya, M. A., Chasteen, T. G., Pinchuanes, S. E. & Vásquez, C. C. (2007). Cysteine metabolism-related genes and bacterial resistance to potassium tellurite. *J Bacteriol*, 189: 8953–60.
- Fuhrer, T., Fischer, E., & Sauer, U. (2005). Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *J Bacteriol*, 187: 1581–90.
- Galloway, D. R. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments. *Mol Microbiol*, 5: 2315–21.
- Gasser, T. (2009). Basiswissen urologie. Springer, 4. Auflage.
- Gebetsberger, J., & Polacek, N. (2013). Slicing tRNAs to boost functional ncRNA diversity. *RNA Biol*, 10: 1798–806.
- Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A. J., Sawitzki, G., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, J. Y., & Zhang, J. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*, 5: R80.
- Giamarellou, H. (2001). Uncomplicated urinary tract infection. *Nephrol Dial Transplant*, 16: 129–131.
- Giguère, S., Prescott, J. F., & Dowling, P. M. (2013). Antimicrobial therapy in veterinary medicine. John Wiley & sons, 5. Auflage.
- Gloyne, L. S., Grant, G. D., Perkins, A. V, Powell, K. L., McDermott, C. M., Johnson, P. V., Anderson, G. J., Kiefel, M., & Anoopkumar-Dukie, S. (2011). Pyocyanin-induced toxicity in A549 respiratory cells is causally linked to oxidative stress. *Toxicol In Vitro*, 25: 1353–8.
- Gordon, N. C., Png, K., & Wareham, D. W. (2010a). Potent synergy and sustained bactericidal activity of a vancomycin-colistin combination versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 54: 5316–22.
- Gordon, O., Vig Slenters, T., Brunetto, P. S., Villaruz, A. E., Sturdevant, D. E., Otto, M., Landmann, R., & Fromm, K. M. (2010). Silver coordination polymers for prevention of implant infection: thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. *Antimicrob Agents Chemother*, 54: 4208–18.
- Gosio, B. (1905). Indicatoren des Bakterienlebens und ihre praktische Bedeutung. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 51: 65-125.

- Goudas, P. C., & Diamandopoulos, A. A. (2011). On some exotic urine colors in ancient and Byzantine Greek literature. *J Nephrol*, 24: 114–22.
- Grant, J. J., & Loake, G. J. (2000). Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol*, 124: 21–9.
- Grass, G., & C Rensing. (2001). Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 183: 2145–7.
- Grass, G., Fan, B., Rosen, B. P., Franke, S., Nies, D. H., & Rensing, C. (2001). ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 183: 4664–7.
- Guzzo, J., Pages, J. M., Duong, F., Lazdunski, A., & Murgier, M. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *J Bacteriol*, 173: 5290–7.
- Hahn, H., Kaufmann, S. H. E., Schulz, T. F., & Suerbaum S. (2009). Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Springer, 6. komplett überarbeitete Auflage.
- Haiko, J., & Westerlund-Wikström, B. (2013). The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology*, 2: 1242–67.
- Halling-Sørensen, B., Lützhøft, H.-C., Andersen, H. R., & Ingerslev, F. (2000). Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother*, 46: 53–8.
- Hamel, R. D., & Appanna, V. D. (2001). Modulation of TCA cycle enzymes and aluminum stress in *Pseudomonas fluorescens*. *J Inorg Biochem*, 129: 1–8.
- Hancock, R. E. (1998). Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis*, 27: 93–9.
- Hancock, V., Dahl, M., & Klemm, P. (2010). Abolition of biofilm formation in urinary tract *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates by metal interference through competition for fur. *Appl Environ Microbiol*, 76: 3836–41.
- Hancock, V., Ferrières, L., & Klemm, P. (2008). The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. *Microbiology*, 154: 167–75.
- Hansen, J. L., Ippolito, J. A., Ban, N., Nissen, P., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2002). The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Mol Cell*, 10: 117–28.

- Hauser, A. R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol*, 7: 654–65.
- Hawkey, P. M. (2003). Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J Antimicrob Chemother*, 51: 29–35.
- Heasman, S. J., & Ridley, A. J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 690–701.
- Hermann, T. (2007). Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. *Cell Mol Life Sci*, 64: 1841–52.
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., & Cabisco, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta*, 1780: 1217–35.
- Hof, H., & Dörries, R. (2009). Medizinische Mikrobiologie. Thieme, 4. überarbeitete und erweiterte Auflage.
- Hoge, R., Pelzer, A., Rosenau, F., & Wilhelm, S. (2010). Weapons of a pathogen: Proteases and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *App Microbiol Biotechnol*, 1: 383–395.
- Hogg, M., Wallace, S. S., & Doublié, S. (2005). Bumps in the road: how replicative DNA polymerases see DNA damage. *Curr Opin Struct Biol*, 15: 86–93.
- Horvat, R. T., & Parmely, M. J. (1988). *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease degrades human gamma interferon and inhibits its bioactivity. *Infect Immun*, 56: 2925–32.
- Huet, O., Petit, J. M., Ratinaud, M. H., & Julien, R. (1992). NADH-dependent dehydrogenase activity estimation by flow cytometric analysis of 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Cytometry*, 13: 532–9.
- Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Ann Rev Microbiol*, 57: 395–418.
- Imlay, J. A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat Rev Microbiol*, 11: 443–54.
- Imlay, J. A. (2006). Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol Microbiol*, 59: 1073–1082.
- Imlay, J. A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem*, 77: 755–776.

- Jana, S., & Deb, J. K. (2006). Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*, 70: 140–50.
- Jia, J., Wang, Y., Zhou, L., & Jin, S. (2006). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* toxin ExoS effectively induces apoptosis in host cells. *Infect Immun*, 74: 6557–70.
- Jenni, W. (2001). Neue Antibiotika gegen grampositive Bakterien und oral wirksame Cephalosporine. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, München.
- Joyce, M. A., Fraser, M. E., James, M. N., Bridger, W. A., & Wolodko, W. T. (2000). ADP-binding site of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase revealed by x-ray crystallography. *Biochemistry*, 39: 17–25.
- Kahne, D., Leimkuhler, C., Lu, W., & Walsh, C. (2005). Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chem Rev*, 105: 425–48.
- Kalan, L., & Wright, G. D. (2011). Antibiotic adjuvants: multicomponent anti-infective strategies. *Expert Rev Mol Med*, 13: e5.
- Kalsi, J., Arya, M., Wilson, P., & Mundy, A. (2003). Hospital-acquired urinary tract infection. *Int J Clin Pract*, 57: 388–91.
- Kato, K., Lillehoj, E. P., Kai, H., & Kim, K. C. (2013). MUC1 expression by human airway epithelial cells mediates *Pseudomonas aeruginosa* adhesion. *Front Biosci (Elite Ed.)*, 2: 68–77.
- Kayser, F. H., Böttger, E. C., Zinkernagel, R. H., Haller, O., Eckert, J., & Deplazes P. (2010). Medizinische Mikrobiologie. Thieme, 12. überarbeitete und erweiterte Auflage.
- Kern, A., Tilley, E., Hunter, I. S., Legisa, M., & Glieder, A. (2007). Engineering primary metabolic pathways of industrial micro-organisms. *J Bacteriol*, 129: 6–29.
- Keren, I., Wu, Y., Inocencio, J., Mulcahy, L. R., & Lewis, K. (2013). Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. *Science*, 339: 1213–16.
- Khakimova, M., Ahlgren, H. G., Harrison, J. J., English, A. M., & Nguyen, D. (2013). The stringent response controls catalases in *Pseudomonas aeruginosa* and is required for hydrogen peroxide and antibiotic tolerance. *J Bacteriol*, 195: 2011–20.
- King, W. E., & Davis, L. (1913). Potassium tellurite as an indicator of microbial life. *Am J Public Health (NY)*, 4: 917–932.

- Kipnis, E., Sawa, T., & Wiener-Kronish, J. (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect*, 36: 78–91.
- Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C. F., & Tümmler, B. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Front Microbiol*, 2: 150.
- Klockgether, J., Würdemann, D., Reva, O., Wiehlmann, L., & Tümmler, B. (2007). Diversity of the abundant pKLC102/PAGI-2 family of genomic islands in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 189: 2443–59.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A., & Collins, J. J. (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 130: 797–810.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Wierzbowski, J., Cottarel, G., & Collins, J. J. (2008). Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell*, 135: 679–90.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol*, 8: 423–435.
- Kong, K. F., Aguila, A., Schneper, L., & Mathee, K. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* β -lactamase induction requires two permeases, AmpG and AmpP. *BMC Microbiol*, 10: 328.
- Kong, K. F., Jayawardena, S. R., Del Puerto, A., Wiehlmann, L., Laabs, U., Tümmler, B., & Mathee, K. (2005). Characterization of *poxB*, a chromosomal-encoded *Pseudomonas aeruginosa* oxacillinase. *Gene*, 358: 82–92.
- Kormutakova, R., Klucar, L., & Turna, J. (2000). DNA sequence analysis of the tellurite-resistance determinant from clinical strain of *Escherichia coli* and identification of essential genes. *Biometals*, 13: 135–9.
- Kretzschmar, U., Khodaverdi, V., Jeoung, J. H., & Görisch, H. (2008). Function and transcriptional regulation of the isocitrate lyase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Microbiol*, 190: 151–8.
- Lau, G. W., Britigan, B. E., & Hassett, D. J. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* OxyR is required for full virulence in rodent and insect models of infection and for resistance to human neutrophils. *Infect Immun*, 73: 2550–3.
- Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., & Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med*, 10: 599–606.

- Leaper, D. J. (2006). Silver dressings: their role in wound management. *Int Wound J*, 3: 282–94.
- Lee, B., Haagenzen, J. A., Ciofu, O., Andersen, J. B., Høiby, N., & Molin, S. (2005b). Heterogeneity of biofilms formed by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 43: 5247–55.
- Lee, S. M., Grass, G., Rensing, C., Barrett, S. R., Yates, C. J., Stoyanov, J. V., & Brown, N. L. (2002). The Pco proteins are involved in periplasmic copper handling in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 295: 616–20.
- Lee, V. T., Smith, R. S., Tu, B., & Lory, S. (2005a). Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system *in vitro* and during infection. *Infect Immun*, 73: 1695–1705.
- Leedjårv, A., Ivask, A., & Virta, M. (2008). Interplay of different transporters in the mediation of divalent heavy metal resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. *J Bacteriol*, 190: 2680–9.
- Leid, J. G., Willson, C. J., Shirtliff, M. E., Hassett, D. J., Parsek, M. R., & Jeffers, A. K. (2005). The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN- γ -mediated macrophage killing. *J Immunol*, 175: 7512–8.
- Leone, I., Chirillo, M. G., Raso, T., Zucca, M., & Savoia, D. (2008). Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 27: 1093–9.
- Lesniak, J., Barton, W. A., & Nikolov, D. B. (2002). Structural and functional characterization of the *Pseudomonas* hydroperoxide resistance protein Ohr. *EMBO J*, 21: 6649–59.
- Lichtenberger, P., & Hooton, T. M. (2008). Complicated urinary tract infections. *Curr Infect Dis Rep*, 10: 499–504.
- Lillehoj, E. P., Hyun, S. W., Kim, B. T., Zhang, X. G., Lee, D. I., Rowland, S., & Kim, K. C. (2001). Muc1 mucins on the cell surface are adhesion sites for *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Lung Cell Mol Physiol*, 280: 181–187.
- Lillehoj, E. P., Kim, B. T., & Kim, K. C. (2002). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 282: L751–6.

- Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*, 22: 582–610.
- Liu, Y., & Imlay, J. A. (2013). Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. *Science*, 339: 1210–13.
- Livermore, D. M. (2002). Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*, 34: 634–40.
- Llano-Sotelo, B., Azucena, E. F. Jr, Kotra, L. P., Mobashery, S., & Chow, C. S. (2002). Aminoglycosides modified by resistance enzymes display diminished binding to the bacterial ribosomal aminoacyl-tRNA site. *Chem Biol*, 9: 455–63.
- Lushchak, V. I. (2001). Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. *Biochemistry (Mosc)*, 66: 476–89.
- Lushchak, V. I. (2011). Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol*, 153: 175–90.
- Macheboeuf, P., Contreras-Martel, C., Job, V., Dideberg, O., & Dessen, A. (2006). Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev*, 30: 673–91.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D., & Clark, D. (2008). Brock Biology of Microorganisms: International Edition. Pearson, 12. Auflage.
- Magnet, S., & Blanchard, J. S. (2005). Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev*, 105: 477–98.
- Mah, T. F., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*, 9: 34–9.
- Mailloux, R. J., Bériault, R., Lemire, J., Singh, R., Chénier, D. R., Hamel, R. D., & Appanna, V. D. (2007). The tricarboxylic acid cycle, an ancient metabolic network with a novel twist. *PloS One*, 2: e690.
- Mailloux, R. J., & Harper, M. E. (2011). Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med*, 51: 1106–15.
- Maki, S., Yoneta, M., & Takada, Y. (2006). Two isocitrate dehydrogenases from a psychrophilic bacterium, *Colwellia psychrerythraea*. *Extremophiles*, 10: 237–49.

- Malik, A., & Aleem, A. (2011). Incidence of metal and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from the river water, agricultural soil irrigated with wastewater and groundwater. *Environ Monit Assess*, 178: 293–308.
- Malik, A., & Jaiswal, R. (2000). Metal resistance in *Pseudomonas* strains isolated from soil treated with industrial wastewater. *World J Microbiol Biotechnol*, 16: 177–82.
- Marnett, L. J. (2002). Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, 181-182: 219–22.
- Martins dos Santos, V. A., Heim, S., Moore, E. R., Strätz, M., & Timmis, K. N. (2004). Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol*, 6: 1264–86.
- Martius, J., Bruhl, P., Dettenkofer, M., Hartenauer, U., Niklas, S., & Piechota, H.-J. (1999). Empfehlung zur Prävention und Kontrolle Katheter-assoziiierter Harnwegsinfektionen. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 42, 806-9.
- Masters, P. A., O'Bryan, T. A., Zurlo, J., Miller, D. Q., & Joshi, N. (2003). Trimethoprim-Sulfamethoxazole Revisited. *Arch Intern Med*, 163: 402–10.
- Mathema, V. B., Thakuri, B. C., & Sillanpää, M. (2011). Bacterial mer operon-mediated detoxification of mercurial compounds: a short review. *Arch Microbiol*, 193: 837–44.
- Matsuo, S., Shirai, H., & Takada, Y. (2010). Isocitrate dehydrogenase isozymes from a psychrotrophic bacterium, *Pseudomonas psychrophila*. *Arch Microbiol*, 192: 639–50.
- Menche, N. (2012). Biologie, Anatomie, Physiologie. Urban & Fischer Verlag/ Elsevier GmbH, 7. Auflage.
- Michel, B. (2005). After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us. *PLoS Biol*, 3: e255.
- Michel-Briand, Y., & Baysse, C. (2002). The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, 84: 499–510.
- Mitchell, G., Gattuso, M., Grondin, G., Marsault, É., Bouarab, K., & Malouin, F. (2011). Tomatidine inhibits replication of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 55: 1937–45.
- Mitchell, G., Lafrance, M., Boulanger, S., Séguin, D. L., Guay, I., Gattuso, M., Marsault, E., Bouarab, K., & Malouin, F. (2012). Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression. *J Antimicrob Chemother*, 67: 559–68.

- Mittal, R., Aggarwal, S., Sharma, S., Chhibber, S., & Harjai, K. (2009). Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. *J Infect Public Health*, 2: 101–111.
- Mittal, R., Khandwaha, R. K., Gupta, V., Mittal, P. K., & Harjai, K. (2006). Phenotypic characters of urinary isolates of *Pseudomonas aeruginosa* & their association with mouse renal colonization. *Indian J Med Res*, 123: 67–72.
- Mittal, R., Sharma, S., Chhibber, S., & Harjai, K. (2008). Iron dictates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in urinary tract infections. *J Biomed Sci*, 15: 731–41.
- Molina-Quiroz, R. C., Muñoz-Villagrán, C. M., de la Torre, E., Tantaleán, J. C., Vásquez, C. C., & Pérez-Donoso, J. M. (2012). Enhancing the antibiotic antibacterial effect by sub lethal tellurite concentrations: tellurite and cefotaxime act synergistically in *Escherichia coli*. *PloS One*, 7: e35452.
- Moore, K. N., Day, R. A., & Albers, M. (2002). Pathogenesis of urinary tract infections: a review. *J Clin Nurs*, 11: 568–74.
- Morales, E., Cots, F., Sala, M., Comas, M., Belvis, F., Riu, M., Salvadó, M., Grau, S., Horcajada, J. P., Montero, M. M., & Castells, X. (2012). Hospital costs of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. *BMC Health Serv Res*, 12: 122–29.
- Morlon-Guyot, J., Méré, J., Bonhoure, A., & Beaumelle, B. (2009). Processing of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A is dispensable for cell intoxication. *Infect Immun*, 77: 3090–9.
- Morones-Ramirez J. R., Winkler J. A., Spina C. S., Collins, J. J. (2013). Silver enhances antibiotic activity against gram-negative bacteria. *Sci Transl Med*, 5: 190ra81.
- Mowat, E., Paterson, S., Fothergill, J. L., Wright, E. A., Ledson, M. J., Walshaw, M. J., Brockhurst, M. A., & Winstanley, C. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* population diversity and turnover in cystic fibrosis chronic infections. *Am J Respir Crit Care Med*, 183: 1674–9.
- Nair, S., & Finkel, S. E. (2004). Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. *J Bacteriol*, 186: 4192–8.
- Nakayama, K., Takashima, K., Ishihara, H., Shinomiya, T., Kageyama, M., Kanaya, S., Ohnishi, M., Murate, T., Mori, H., & Hayashi, T. (2000). The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. *Mol Microbiol*, 38: 213–31.

- Narten, M., Rosin, N., Schobert, M., & Tielen, P. (2012). Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract isolates and influence of urinary tract conditions on antibiotic tolerance. *Curr Microbiol*, 64: 7–16.
- Narten, M. (2011). Charakterisierung der Antibiotika-Resistenz-Mechanismen von *Pseudomonas aeruginosa* unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Nascimento, A. M., & Chartone-Souza, E. (2003). Operon mer: bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genet Mol Res*, 2: 92–101.
- Nguyen D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer, K., McKay, G., Siehnel, R., Schafhauser, J., Wang, Y., Britigan, B. E., & Singh, P. K. (2011). Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science*, 334: 982–6.
- Nicas, T. I., & Hancock, R. E. (1983). *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability: isolation of a porin protein F-deficient mutant. *J Bacteriol*, 153: 281–5.
- Nicolle, L. E. (2008). The prevention of hospital-acquired urinary tract infection. *Clin Infect Dis*, 46: 251–3.
- Nicolle, L. E. (2013). Urinary tract infection in long-term care facilities. *Healthcare Infection*, 19: 4–12.
- Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51: 730–50.
- Nosseir, S. B., Lind, L. R., & Winkler, H. A. (2012). Recurrent uncomplicated urinary tract infections in women: a review. *J Womens Health*, 21: 347–54.
- O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J., Rasmussen, G. T., Abdalla, M. Y., Denning, G. M., & Britigan, B. E. (2003). The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Am Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 285: L1077–86.
- O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J., Spitz, D. R., Denning, G. M., & Britigan, B. E. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287: L94–103.
- Obritsch, M. D., Fish, D. N., MacLaren, R., & Jung, R. (2005). Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy*, 25: 1353–64.

- Ochsner, U. A., Vasil, M. L., Alsabbagh, E., Parvatiyar, K. & Hassett, D. J. (2000). Role of the *Pseudomonas aeruginosa* oxyR-recG operon in oxidative stress defense and DNA Repair: OxyR-dependent regulation of katB-ankB , ahpB , and aphC-ahpF. *J Bacteriol*, 182: 4533–44.
- Orell, A., Navarro, C. A., Arancibia, R., Mobarec, J. C., & Jerez, C. A. (2010). Life in blue: copper resistance mechanisms of bacteria and archaea used in industrial biomining of minerals. *Biotechnol Adv*, 28: 839–48.
- Ostroff, R. M., Vasil, A. I., & Vasil, M. L. (1990). Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 172: 5915–23.
- Palma, M., DeLuca, D., Worgall, S., & Luis, E. N. (2004). Transcriptome analysis of the response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide. *J Bacteriol*, 186: 248–52.
- Park, H. J., Kim, J. Y., Kim, J., Lee, J. H., Hahn, J. S., Gu, M. B., & Yoon, J. (2009). Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. *Water Res*, 43: 1027–32.
- Parmely, M., Gale, A., Clabaugh, M., Horvat, R., & Zhou, W. W. (1990). Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 58: 3009–14.
- Pasca, M. R., Dalla Valle, C., De Jesus Lopes Ribeiro, A. L., Buroni, S., Papaleo, M. C., Bazzini, S., Udine, C., Incandela, M. L., Daffara, S., Fani, R., Riccardi, G., & Marone, P. (2012). Evaluation of fluoroquinolone resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* multidrug resistance clinical isolates. *Microb Drug Resist*, 18: 23–32.
- Pérez, J. M., Calderón, I. L., Arenas, F. A., Fuentes, D. E., Pradenas, G. A., Fuentes, E. L., Sandoval, J. M., Castro M. E., Elías, A. O., & Vásquez, C. C. (2007). Bacterial toxicity of potassium tellurite: unveiling an ancient enigma. *PloS One*, 2: e211.
- Perron, K., Caille, O., Rossier, C., Van Delden, C., Dumas, J. L., & Köhler, T. (2005). CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, 279: 8761–8.
- Pfeifer, Y., Cullik, A., & Witte, W. (2010). Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol*, 300: 371–9.
- Pier, G. B., Coleman, F., Grout, M., Franklin, M., & Ohman, D. E. (2001). Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. *Infect Immun*, 69: 1895–901.

- Pieren, M., & Tigges, M. (2012). Adjuvant strategies for potentiation of antibiotics to overcome antimicrobial resistance. *Curr Opin Pharmacol*, 12: 551–5.
- Poole, K. (2004). Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci*, 61: 2200–23.
- Poole, K. (2005). Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 479–487.
- Poole, K. (2012a). Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*, 67: 2069–89.
- Poole, K. (2012b). Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol*, 20: 227–34.
- Poon, V. K., & Burd, A. (2004). *In vitro* cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care. *Burns.*, 30: 140–7.
- Posselt, D. (2006). Eisen(diarylsalen)-Komplexe als neuartige Zytostatika: Synthese, pharmakologische und biochemische Untersuchungen zum Wirkmechanismus. Dissertation, Freie Universität Berlin, Berlin.
- Prousek, J. (2007). Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure Appl Chem*, 79: 2325–38.
- Pschyrembel. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. de Gruyter, 2004.
- Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv*, 27: 76–83.
- Raina, M., & Ibba, M. (2014). tRNAs as regulators of biological processes. *Front Genet*, 5: 171.
- Ramphal, R., Small, P. M., & Shands, J. W. Jr, Fischlschweiger, W., & Small, P. A. Jr. (1980). Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to tracheal cells injured by influenza infection or by endotracheal intubation. *Infect Immun*, 27: 614–9.
- Rawlings, N. D., Morton, F. R., & Barrett, A. J. (2006). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*, 34: D270–2.
- Reinoso, C. A., Auger, C., Appanna, V. D., & Vásquez, C. C. (2012). Tellurite-exposed *Escherichia coli* exhibits increased intracellular α -ketoglutarate. *Biochem Biophys Res Commun*, 421: 721–6.

- Reiter, R. J., Tan, D., Manchester, L. C., & Qi, W. (2001). Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *Cell Biochem Biophys*, 34: 237–56.
- Rensing, C., & Grass, G. (2003). *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev*, 27: 197–213.
- Rigobello, M. P., Gandin, V., Folda, A., Rundlöf, A. K., Fernandes, A. P., Bindoli, A., Marzano, C., & Björnstedt, M. (2009). Treatment of human cancer cells with selenite or tellurite in combination with auranofin enhances cell death due to redox shift. *Free Radic Biol Med*, 47: 710–21.
- Ronald, A. (2002). The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Dis Mon*, 49: 71–82.
- Rosin, N. (2010). Physiologie von *Pseudomonas aeruginosa* unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Rossolini, G. M., & Mantengoli, E. (2005). Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*, 11: 17–32.
- Saager, B. (2008). Molekulare Grundlagen der Mechanismen und Epidemiologie von Resistenzen gegenüber neuen Antibiotika bei Gram-positiven klinischen Isolatzen aus dem Norddeutschen Raum. Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg.
- Salunkhe, P., Töpfer, T., Buer, J., & Tümmler, B. (2005). Genome-wide transcriptional profiling of the steady-state response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide. *J Bacteriol*, 187: 2565–72.
- Samanidou, V. F., Demetriou, C. E., & Papadoyannis, I. N. (2003). Direct determination of four fluoroquinolones, enoxacin, norfloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin, in pharmaceuticals and blood serum by HPLC. *Anal Bioanal Chem*, 375: 623–9.
- Sanchez, C. J., Akers, K. S., Romano, D. R., Woodbury, R. L., Hardy, S. K., Murray, C. K., & Wenke, J. C. (2014). D-amino acids enhance the activity of antimicrobials against biofilms of clinical wound isolates of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(8), 4353–61.
- Sandoval, J. M., Arenas, F. A., & Vásquez, C. C. (2011). Glucose-6-phosphate dehydrogenase protects *Escherichia coli* from tellurite-mediated oxidative stress. *PLoS One*, 6: e25573.

- Sandoval, J. M., Levêque, P., Gallez, B., Vásquez, C. C., & Buc Calderon, P. (2010). Tellurite-induced oxidative stress leads to cell death of murine hepatocarcinoma cells. *Biometals*, 23: 623–32.
- Sandoval, J. M., Verrax, J., Vásquez, C. C., & Buc Calderon, P. (2012). A comparative study of tellurite toxicity in normal and cancer cells. *Mol Cell Toxicol*, 8: 327–34.
- Sato, H., Feix, J. B., & Frank, D. W. (2006). Identification of superoxide dismutase as a cofactor for the pseudomonas type III toxin, ExoU. *Biochemistry*, 45: 10368–75.
- Sayner, S. L., Frank, D. W., King, J., Chen, H., VandeWaa, J., & Stevens, T. (2004). Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circ Res*, 95: 196–203.
- Schreiber, K., Boes, N., Eschbach, M., Jaensch, L., Wehland, J., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Hentzer, M., & Schobert, M. (2006). Anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* by pyruvate fermentation requires an Usp-type stress protein. *J Bacteriol*, 188: 659–68.
- Schreiber, K., Krieger, R., Benkert, B., Eschbach, M., Arai, H., Schobert, M., & Jahn, D. (2007). The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration. *J Bacteriol*, 189: 4310–4.
- Schroeder, R., Waldsich, C., & Wank, H. (2000). Modulation of RNA function by aminoglycoside antibiotics. *EMBO J*, 19: 1–9.
- Schroeder, T. H., Zaidi, T., & Pier, G. B. (2001). Lack of adherence of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to asialo-GM(1) on epithelial cells. *Infect Immun*, 69: 719–29.
- Schultz-Lampel, D., Haferkamp, A., & Goepel, M. (2012). Urodynamik: Akademie der Deutschen Urologen. Springer, 3. Auflage.
- Schurek, K. N., Marr, A. K., Taylor, P. K., Wiegand, I., Semenec, L., Khaira, B. K., & Hancock, R. E. (2008). Novel genetic determinants of low-level aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 52: 4213–9.
- Sharma, U. K., & Chatterji, D. (2010). Transcriptional switching in *Escherichia coli* during stress and starvation by modulation of sigma activity. *FEMS Microbiol Rev*, 34: 646–57.
- Shibuya, Y., Yamamoto, T., Morimoto, T., Nishino, N., Kambara, T., & Okabe, H. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* alkaline proteinase might share a biological function with plasmin. *Biochim Biophys Acta*, 1077: 316–24.

- Shigemura, K., Arakawa, S., Sakai, Y., Kinoshita, S., Tanaka, K., & Fujisawa, M. (2006). Complicated urinary tract infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* in a single institution (1999-2003). *Int J Urol*, 13: 538–42.
- Silby, M. W., Cerdeño-Tárraga, A. M., Vernikos, G. S., Giddens, S. R., Jackson, R. W., Preston, G. M., Zhang, X. X., Moon, C. D., Gehring, S. M., Godfrey, S. A., Knight, C. G., Malone, J. G., Robinson, Z., Spiers, A. J., Harris, S., Challis, G. L., Yaxley, A. M., Harris, D., Seeger, K., Murphy, L., Rutter, S., Squares, R., Quail, M. A., Saunders, E., Mavromatis, K., Brettin, T. S., Bentley, S. D., Hothersall, J., Stephens, E., Thomas, C. M., Parkhill, J., Levy, S. B., Rainey, P. B., & Thomson, N. R. (2009). Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biol*, 10:R51.
- Silver, S. (2003). Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol Rev*, 27: 341–53.
- Singh, R., Lemire, J., Mailloux, R. J., & Appanna, V. D. (2008). A novel strategy involved in anti-oxidative defense: the conversion of NADH into NADPH by a metabolic network. *PloS One*, 3: e2682.
- Singh, R., Lemire, J., Mailloux, R. J., Chénier, D., Hamel, R., & Appanna, V. D. (2009). An ATP and oxalate generating variant tricarboxylic acid cycle counters aluminum toxicity in *Pseudomonas fluorescens*. *PloS One*, 4: e7344.
- Singh, R., Mailloux, R. J., Puiseux-Dao, S., & Appanna, V. D. (2007). Oxidative stress evokes a metabolic adaptation that favors increased NADPH synthesis and decreased NADH production in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol*, 189: 6665–75.
- Skiada, A., Markogiannakis, A., Plachouras, D., & Daikos, G. L. (2011). Adaptive resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*, 37: 187–93.
- Song, B., & Leff, L. G. (2006). Influence of magnesium ions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiol Res*, 161: 355–61.
- Sonnleitner, E., Gonzalez, N., Sorger-Domenigg, T., Heeb, S., Richter, A. S., Backofen, R., Williams, P., Hüttenhofer, A., Haas, D., & Bläsi, U. (2011). The small RNA PhrS stimulates synthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal. *Mol Microbiol*, 80: 868–85.
- Sonnleitner, E., & Haas, D. (2011). Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *App Microbiol Biotechnol*, 91: 63–79.

- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2000). Protein oxidation. *Ann NY Acad Sci*, 899: 191–208.
- Stepanauskas, R., Glenn, T. C., Jagoe, C. H., Tuckfield, R. C., Lindell, A. H., King, C. J., & McArthur, J. V. (2006). Coselection for microbial resistance to metals and antibiotics in freshwater microcosms. *Environ Microbiol*, 8: 1510–4.
- Stickland, H. G., Davenport, P. W., Lilley, K. S., Griffin, J. L., & Welch, M. (2010). Mutation of *nfxB* causes global changes in the physiology and metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Proteome Res*, 9: 2957–67.
- Stickler, D. J. (1999). Biofouling, chapter bacterial biofilms and the encrustation of urethral catheters. Taylor & Francis Group.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagel, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S., & Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406: 959–64.
- Strateva, T., & Mitov, I. (2011). Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Ann Microbiol*, 61: 717–32.
- Sultana, R., Perluigi, M., & Butterfield, D. A. (2006). Protein oxidation and lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease: insights into mechanism of neurodegeneration from redox proteomics. *Antioxid Redox Signal*, 8: 2021–37.
- Summers, A. O. (2002). Generally overlooked fundamentals of bacterial genetics and ecology. *Clin Infect Dis*, 34: 85–92.
- Takahashi, K., & Sawasaki, Y. (1991). Human endothelial cell line, ECV304, produces pro-urokinase. *In Vitro Cell Dev Biol*, 27: 766–8.
- Takahashi, K., & Sawasaki, Y. (1992). Rare spontaneously transformed human endothelial cell line provides useful research tool. *In Vitro Cell Dev Biol*, 28: 380–2.
- Takahashi, K., Sawasaki, Y., Hata, J., & Goto, T. (1990). Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol*, 26: 265–74.
- Talan, D. A., Naber, K. G., Palou, J., & Elkharrat, D. (2004). Extended-release ciprofloxacin (Cipro XR) for treatment of urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents*, 23: 54–66.

- Taylor, D. E. (1999). Bacterial tellurite resistance. *Trends Microbiol*, 7: 111–5.
- Taylor, D. E., Hou, Y., Turner, R. J., & Weiner, J. H. (1994). Location of a potassium tellurite resistance operon (tehA tehB) within the terminus of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 176: 2740–2.
- Teitzel, G. M., & Parsek, M. R. (2003). Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, 69: 2310–20.
- Thapa, B. R., & Walia, A. (2007). Liver function tests and their interpretation. *Indian Journal of Pediatrics*, 74: 663–71.
- Tielen, P., Narten, M., Rosin, N., Biegler, I., Haddad, I., Hogardt, M., Neubauer, R., Wiehlmann, L. & Jahn, D. (2011). Genotypic and phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from urinary tract infections. *Int J Med Microbiol*, 301: 282–92.
- Tielen, P., Rosin, N., Meyer, A. K., Dohnt, K., Haddad, I., Jänsch, L., Klein, J., Narten, M., Pommerenke, C., Scheer, M., Schobert, M., Schomburg, D., Thielen, B., & Jahn, D. (2013). Regulatory and metabolic networks for the adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to urinary tract-like conditions. *PLoS One*, 8: e71845.
- Tielen, P., Wibberg, D., Blom, J., Rosin, N., Meyer, A. K., Bunk, B., Schobert, M., Tüpker, R., Schatschneider, S., Rückert, C., Albersmeier, A., Goesmann, A., Vorhölter, F. J., Jahn, D., & Pühler, A. (2014). Genome sequence of the small-colony variant *Pseudomonas aeruginosa* MH27, isolated from a chronic urethral catheter. *Genome Announce*, 2: e01174–13.
- Toledo-Arana, A., Repoila, F., & Cossart, P. (2007). Small noncoding RNAs controlling pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 10: 182–8.
- Touati, D. (2000). Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys*, 373: 1–6.
- Traxler, M. F., Summers, S. M., Nguyen, H. T., Zacharia, V. M., Hightower, G. A., Smith, J. T., & Conway, T. (2008). The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 68: 1128–48.
- Tremaroli, V., Fedi, S., & Zannoni, D. (2007). Evidence for a tellurite-dependent generation of reactive oxygen species and absence of a tellurite-mediated adaptive response to oxidative stress in cells of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *Arch Microbiol*, 187: 127–35.
- Tretter, L., & Adam-Vizi, V. (2005). Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360: 2335–45.

- Turner, R. J., Aharonowitz, Y., Weiner, J. H., & Taylor, D. E. (2001). Glutathione is a target in tellurite toxicity and is protected by tellurite resistance determinants in *Escherichia coli*. *Can J Microbiol*, 74: 33-40.
- Turner, R. J., (2001). Tellurite toxicity and resistance in Gram-negative bacteria. *Recent Res Dev Microbiol*, 5: 1311-4.
- Upritchard, H. G., Yang, J., Bremer, P. J., Lamont, I. L., & McQuillan, A. J. (2007). Adsorption to metal oxides of the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyoverdine and implications for bacterial biofilm formation on metals. *Langmuir*, 23: 7189-95.
- Vakulenko, S. B., & Mobashery, S. (2003). Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev*, 16: 430-50.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39: 44-84.
- Valkovicova, L., Valkova, D., Vavrova, S., Alekhina, O., Hoang, V. P., Jezna, M., & Turna, J. (2011). The role of TerW protein in the tellurite resistance of uropathogenic *Escherichia coli*. *Biologia*, 66: 565-73.
- Van Aelst, L., & D'Souza-Schorey, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*, 11: 2295-322.
- Van Bambeke, F., Balzi, E., & Tulkens, P. M. (2000). Antibiotic Efflux Pumps. *Biochem Pharmacol*, 60: 457-70.
- Van Delden, C., & Iglewski, B. H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis*, 4: 551-60.
- Vasil, M. L. (2007). How we learnt about iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*: a series of very fortunate events. *Biometals.*, 20: 587-601.
- Vásquez, C. C., Saavedra, C. P., Loyola, C. A., Araya, M. A., & Pichuanes, S. (2001). The product of the *cysK* gene of *Bacillus stearothermophilus* V mediates potassium tellurite resistance in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol*, 43: 418-23.
- Veesenmeyer, J. L., Hauser, A. R., Lisboa, T., & Rello, J. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. *Crit Care Med*, 37: 1777-86.
- Vicens, Q., & Westhof, E. (2002). Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding a site. *Chem Biol*, 9: 747-55.

- Vinckx, T., Wei, Q., Matthijs, S., & Cornelis, P. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* oxidative stress regulator OxyR influences production of pyocyanin and rhamnolipids: protective role of pyocyanin. *Microbiology*, 156: 678–86.
- Vinella, D., Albrecht, C., Cashel, M., & D'Ari, R. (2005). Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 56: 958–70.
- Vogt, S. L., Green, C., Stevens, K. M., Day, B., Erickson, D. L., Woods, D. E., & Storey, D. G. (2011). The stringent response is essential for *Pseudomonas aeruginosa* virulence in the rat lung agar bead and *Drosophila melanogaster* feeding models of infection. *Infect Immun*, 79: 4094–104.
- Wainwright, M. (2008). Dyes in the development of drugs and pharmaceuticals. *Dyes and Pigments*, 76: 582–9.
- Walsh, C. (2003). Where will new antibiotics come from? *Nat Rev Microbiol*, 1: 65–70.
- Wang, X., & Zhao, X. (2009). Contribution of oxidative damage to antimicrobial lethality. *Antimicrob Agents Chemother*, 53: 1395–402.
- Wang, X., Zhao, X., Malik, M., & Drlica, K. (2010). Contribution of reactive oxygen species to pathways of quinolone-mediated bacterial cell death. *J Antimicrob Chemother*, 65: 520–4.
- Wibberg, D., Tielen, P., Blom, J., Rosin, N., Schobert, M., Töpker, R., Schatschneider, S., Spilker, D., Albersmeier, A., Goesmann, A., Vorhölter, F. J., & Jahn, D. (2014). Genome sequence of the acute urethral catheter isolate *Pseudomonas aeruginosa* MH38. *Genome Announce*, 2: 2011–2.
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*, 3: 163–75.
- Wiehlmann, L., Wagner, G., Cramer, N., Siebert, B., Gudowius, P., Morales, G., Köhler, T., Van Delden, C., Weinel, C., Slickers, P., & Tümmler, B. (2007). Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 8101–6.
- Wilke, M. S., Lovering, A. L., & Strynadka, N. C. (2005). Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol*, 8: 525–33.
- Wittmann, C. (2007). Fluxome analysis using GC-MS. *Microb Cell Fact*, 6:6.

- Wittmann, C., & Heinzle, E. (2002). Genealogy profiling through strain improvement by using metabolic network analysis : metabolic flux genealogy of several generations of lysine-producing *Corynebacteria*. *Appl Environ Microbiol*, 68: 5843–59.
- Worthington, R. J., & Melander, C. (2013). Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. *Trends Biotechnol*, 31: 177–84.
- Wu, J., & Xie, J. (2009). Magic spot: (p) ppGpp. *J Cell Physiol*, 220: 297–302.
- Yahr, T. L., Vallis, A. J., Hancock, M. K., Barbieri, J. T., & Frank, D. W. (1998). ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 13899–904.
- Yang, Y. H., & Paquet, A. C. (2005). Preprocessing two-color spotted arrays. statistics for Biology and Health. Springer, 49-69.
- Zannoni, D., Borsetti, F., Harrison, J. J., & Turner, R. J. (2008). The bacterial response to the chalcogen metalloids Se and Te. *Adv Microb Physiol*, 53: 1-72.
- Zawadzka, A. M., Crawford, R. L., Andrzej, J., & Paszczynski, A. J. (2006). Pyridine-2 , 6-bis(thiocarboxylic acid) produced by *Pseudomonas stutzeri* KC reduces and precipitates selenium and tellurium oxyanions. *Appl Environ Microbiol*, 72: 3119–29.
- Zhang, L., Koay, M., Maher, M. J., Xiao, Z., & Wedd, A. G. (2006). Intermolecular transfer of copper ions from the CopC protein of *Pseudomonas syringae*. Crystal structures of fully loaded Cu(I)Cu(II) forms. *J Am Chem Soc*, 128: 5834–50.
- Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of Denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61: 533–616.

Anhang

Tabelle 22: Sensitivität von den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten MH19, MH27, MH38 und RN21 sowie von dem Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 gegenüber Ceftazidim, Ciprofloxacin und Tobramycin. Die MIC-Werte wurden nach einer 18-stündigen Kultivierung bei 37 °C unter aeroben Bedingungen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

	AUM	1:10 LB
<i>P. aeruginosa</i> -Isolat	MIC [µg/ml] Ceftazidim	
MH19	12 ± 0.0 ¹	9 ± 1.15 ¹
MH27	30 ± 0.0 ¹	21 ± 1.15 ¹
MH38	n.n ⁴	n.n
RN21	21 ± 2.31 ¹	22 ± 0.0 ¹
PAO1	29 ± 1.15 ¹	20 ± 2.0 ¹
MIC [µg/ml] Ciprofloxacin		
<i>P. aeruginosa</i> -Isolat		
MH19	8.0 ± 0.8 ³	6.0 ± 0.8 ³
MH27	7.7 ± 0.6 ²	10.3 ± 0.6 ²
MH38	n.n	n.n
RN21	10.0 ± 1.9 ³	12.0 ± 1.7 ³
PAO1	15.0 ± 1.1 ³	15.0 ± 1.1 ³
MIC [µg/ml] Tobramycin		
<i>P. aeruginosa</i> -Isolat		
MH19	82.0 ± 7.0 ³	60.0 ± 9.4 ³
MH27	n.n	n.n
MH38	n.n	n.n
RN21	80.0 ± 0.0 ³	80.0 ± 0.0 ³
PAO1	77.0 ± 5.2 ³	54.0 ± 5.0 ³

¹⁾ in dieser Arbeit ermittelt

²⁾ in Zusammenarbeit mit W. Michel bestimmt

³⁾ von Dr. M. Narten bestimmt (Narten, 2011)

⁴⁾ n.n. nicht nachweisbar

Tabelle 23: Singletons von den uropathogenen *P. aeruginosa*-Isolaten MH19, MH27, MH38 und RN21, die mit einer Resistenz gegenüber Schwermetallen sowie Tellurit in Verbindung gebracht werden können.

MH19	MH27	MH38	RN21	<i>P. aeruginosa</i> -Isolate	
Locus Tag				Genname	Beschreibung
PaMH19_6074	PaMH27_2661	PaMH38_3668	PaRN21_2378	<i>zitB</i>	zinc transporter
PaMH19_6167	/	/	/		zinc transporter
PaMH19_3373	PaMH27_5123	/	/	<i>merA</i>	mercuric reductase
PaMH19_3371	PaMH27_5126	/	/	<i>merR</i>	mercuric resistance operon regulatory protein
/	PaMH27_6051	/	/	<i>merT</i>	mercuric transport protein
/	/	PaMH38_5236	/	<i>merD</i>	mercuric resistance protein
PaMH19_6375	PaMH27_2404	/	/	<i>terA</i>	tellurium resistance protein TerA
PaMH19_6410	PaMH27_5395			<i>terA</i>	tellurium resistance protein TerA
PaMH19_6409	PaMH27_5394	/	/	<i>terB</i>	tellurium resistance protein TerB
PaMH19_6408	PaMH27_5393	/	/	<i>terC</i>	tellurium resistance protein TerC
/	PaMH27_6239	/	/	<i>terC</i>	inner membrane protein TerC
PaMH19_6407	PaMH27_5392	/	/	<i>terD</i>	tellurium resistance protein TerC
/	PaMH27_5391	/	/	<i>terE</i>	cAMP binding protein TerE
PaMH19_6411	PaMH27_5396	/	/	<i>terZ</i>	uncharacterized protein TerZ
PaMH19_6175	PaMH27_2601	PaMH38_3767	PaRN21_2296		copper resistance protein K
/	/	/	PaRN21_2303	<i>pcoA</i>	copper resistance protein A
PaMH19_6173	/	PaMH38_3761	PaRN21_2302	<i>pcoB</i>	copper resistance protein B
PaMH19_6177	PaMH27_2603	PaMH28_3765	PaRN21_2298	<i>pcoC</i>	copper resistance protein C

Tabelle 23: Fortsetzung

MHI9	MH27	MH38	RN21	Genname	Beschreibung
<i>P. aeruginosa</i> -Isolate					
/	PaMH27_2608	/	/	<i>copA</i>	twin-arginine translocating pathway signal; copper resistance
PaMH19_6172	/	PaMH38_3760	/	<i>copA</i>	copper resistance protein A
/	PaMH27_2607	/	/	<i>copB</i>	copper resistance protein B
/	PaMH27_2604	/	/	<i>copF</i>	putative cation transporting P-type ATPase
PaMH19_6075	PaMH27_2659	PaMH38_3670	PaRN21_2376	<i>cueR</i>	HTH-type transcriptional regulator
/	PaMH27_5124	/	/	<i>merP</i>	copper-transporting ATPase
/	/	PaMH38_2009	PaRN21_3936	<i>csor</i>	copper-sensing transcriptional repressor
PaMH19_6146	/	PaMH38_3736	/		copper-translocating P-type ATPase
PaMH19_6163	/	PaMH38_3731	/	<i>hmrR</i>	copper efflux regulator
/	PaMH27_6050	PaMH38_3756	/		copper-exporting P-type ATPase
/	/	/	PaRN21_3129		copper-transporting ATPase
PaMH19_6176	/	/	PaRN21_2299		Cu(II)-exporting ATPase

Tabelle 24: Das Transkriptionsprofil von *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin im Vergleich zum Standard. Aufgelistet sind Gene mit einer statistisch signifikanten Veränderung bezüglich der Transkriptmenge ($\log FC > \pm 0.8$).

Systematischer Name	Genname	Beschreibung	logFC
PA0642	PA0642	hypothetical protein	5.86
PA0985	pyoS5	pyocin S5	5.69
PA0635	PA0635	hypothetical protein	5.64
PA0636*	PA0636	bacteriophage protein	5.51
PA0625*	PA0625	bacteriophage protein	5.50
PA0646*	PA0646	bacteriophage protein	5.28
PA0614*	PA0614	bacteriophage protein	5.24
PA1150	<i>pys2</i>	pyocin S2	5.10
PA0643*	PA0643	bacteriophage protein	4.95
PA0633*	PA0633	bacteriophage protein	4.95
PA0640	PA0640	bacteriophage protein	4.93
PA0632	PA0632	hypothetical protein	4.91
PA0647	PA0647	hypothetical protein	4.90
PA3866	PA3866	pyocin protein	4.90
PA0629*	PA0629	bacteriophage protein	4.80
PA0623	PA0623	bacteriophage protein	4.69
PA0622	PA0622	bacteriophage protein	4.69
PA0638	PA0638	bacteriophage protein	4.56
PA0615	PA0615	hypothetical protein	4.51
PA0644	PA0644	hypothetical protein	4.49
PA0645	PA0645	hypothetical protein	4.48
PA0627*	PA0627	bacteriophage protein	4.45
PA0626*	PA0626	bacteriophage protein	4.42
PA0619	PA0619	bacteriophage protein	4.40
PA0637*	PA0637	bacteriophage protein	4.37
PA0639*	PA0639	bacteriophage protein	4.34
PA0630	PA0630	hypothetical protein	4.30
PA0648	PA0648	hypothetical protein	4.21
PA0634	PA0634	hypothetical protein	4.20
PA0617	PA0617	bacteriophage protein	4.18
PA0616*	PA0616	bacteriophage protein	4.14
PA0624	PA0624	hypothetical protein	4.13
PA0618	PA0618	bacteriophage protein	4.09
PA0641	PA0641	bacteriophage protein	3.99
PA0613	PA0613	hypothetical protein	3.99
PA0631	PA0631	hypothetical protein	3.98
PA0612	<i>ptrB</i>	repressor, PtrB	3.96
PA0628*	PA0628	bacteriophage protein	3.91
PA0910	PA0910	hypothetical protein	3.66

Tabelle 24: Fortsetzung.

PA0621*	PA0621	bacteriophage protein	3.59
PA0620	PA0620	bacteriophage protein	3.54
PA0909	PA0909	hypothetical protein	3.54
PA0911	PA0911	hypothetical protein	3.30
PA0610	<i>prtN</i>	transcriptional regulator PrtN	3.17
PA0908	PA0908	hypothetical protein	2.93
PA0807	<i>ampDh3</i>	AmpDh3	2.88
PA4763	<i>recN</i>	DNA repair protein RecN	2.83
PA3540	<i>algD</i>	GDP-mannose 6-dehydrogenase AlgD	2.68
PA0669	PA0669	DNA polymerase alpha chain	2.67
PA0671	PA0671	hypothetical protein	2.65
PA0808	PA0808	hypothetical protein	2.58
PA3007	<i>lexA</i>	LexA repressor	2.56
PA5429	<i>aspA</i>	aspartate ammonia-lyase	2.54
PA0907	PA0907	hypothetical protein	2.45
PA0922	PA0922	hypothetical protein	2.43
PA2288	PA2288	hypothetical protein	2.38
PA3008 [#]	PA3008	SOS response cell division inhibitor	2.34
PA0670 [#]	PA0670	DNA repair nucleotidyltransferase	2.20
PA3413	PA3413	hypothetical protein	2.13
PA0657	PA0657	ATPase	2.11
PA0519	<i>nirS</i>	nitrite reductase precursor	2.08
PA3414	PA3414	hypothetical protein	2.06
PA1865	PA1865	hypothetical protein	2.04
PA5171	<i>arcA</i>	arginine deiminase	2.02
PA3617	<i>recA</i>	recombinase A	2.02
PA5170	<i>arcD</i>	arginine/ornithine antiporter	1.99
PA0069 [#]	PA0069	DNA repair photolyase	1.94
PA3616	PA3616	recombination regulator RecX	1.92
PA0819	PA0819	hypothetical protein	1.88
PA4704.2	<i>prrF2</i>	regulatory RNA PrrF2	1.86
PA1151	<i>imm2</i>	pyocin S2 immunity protein	1.84
PA5172	<i>arcB</i>	ornithine carbamoyltransferase	1.82
PA5173	<i>arcC</i>	carbamate kinase	1.80
PA2426	<i>pvdS</i>	extracytoplasmic-function sigma-70 factor	1.76
PA3305.1	<i>phrS</i>	PhrS	1.75
PA4067	<i>oprG</i>	Outer membrane protein OprG precursor	1.74
PA0518	<i>nirM</i>	cytochrome c-551 precursor	1.73
PA0815	PA0815	transcriptional regulator	1.71
PA5427	<i>adhA</i>	alcohol dehydrogenase	1.70
PA4704.1	<i>prrF1</i>	regulatory RNA PrrF1	1.66
PA0649	<i>trpG</i>	anthranilate synthase component II	1.66
PA0650	<i>trpD</i>	anthranilate phosphoribosyltransferase	1.54
PA0828	PA0828	transcriptional regulator	1.53

Tabelle 24: Fortsetzung.

PA2398	<i>fpvA</i>	ferripyoverdine receptor	1.53
PA0320	PA0320	hypothetical protein	1.48
PA0654	<i>speD</i>	S-adenosylmethionine decarboxylase	1.42
PA0906	PA0906	transcriptional regulator	1.39
PA2412 [#]	PA2412	MbtH-like protein	1.37
PA0672	<i>hemO</i>	heme oxygenase	1.36
PA0829	PA0829	hydrolase	1.36
PA3613	PA3613	hypothetical protein	1.34
PA0611	<i>prtR</i>	transcriptional regulator PrtR	1.34
PA1362	PA1362	hypothetical protein	1.34
PA1673	PA1673	hypothetical protein	1.33
PA0817	PA0817	ring-cleaving dioxygenase	1.32
PA0651	<i>trpC</i>	indole-3-glycerol-phosphate synthase	1.32
PA1152	PA1152	hypothetical protein	1.32
PA0545 [#]	PA0545	putative reductase	1.31
PA1546	<i>hemN</i>	coproporphyrinogen III oxidase	1.31
PA0836.1	P5	P5	1.30
PA0653 [#]	PA0653	redox protein	1.29
PA4348	PA4348	flavoprotein	1.28
PA3309	PA3309	hypothetical protein	1.27
PA0090	<i>clpVI</i>	ClpVI	1.24
PA5475 [#]	PA5475	acetyltransferase	1.24
PA2958.1	<i>rgsA</i>	RgsA	1.23
PA0327 [#]	PA0327	transcriptional regulator	1.22
PA4587	<i>ccpR</i>	cytochrome c551 peroxidase precursor	1.22
PA0084	<i>tssC1</i>	hypothetical protein	1.22
PA2386	<i>pvdA</i>	L-ornithine N5-oxygenase	1.22
PA0141	PA0141	hypothetical protein	1.19
PA0663	PA0663	hypothetical protein	1.17
PA0524	<i>norB</i>	nitric-oxide reductase subunit B	1.14
PA0083	<i>tssB1</i>	hypothetical protein	1.11
PA0839	PA0839	transcriptional regulator	1.11
PA3621.1	<i>rsmZ</i>	regulatory RNA RsmZ	1.11
PA0086	<i>tagJ1</i>	hypothetical protein	1.11
PA0091	<i>vgrG1</i>	VgrG1	1.10
PA1746	PA1746	hypothetical protein	1.10
PA3572	PA3572	hypothetical protein	1.05
PA0820	PA0820	hypothetical protein	1.05
PA5446	PA5446	hypothetical protein	1.05
PA0087	<i>tssE1</i>	hypothetical protein	1.04
PA0674	<i>vreA</i>	VreA	1.03
PA0931	<i>pirA</i>	outer membrane receptor FepA	1.02
PA4710	<i>phuR</i>	heme/hemoglobin uptake outer membrane receptorPhuR precursor	0.99

Tabelle 24: Fortsetzung

PA0085	<i>hcp1</i>	Hcp1	0.99
PA0093	PA0093	hypothetical protein	0.97
PA0082	<i>tssA1</i>	hypothetical protein	0.97
PA4709	PA4709	hemin degrading factor	0.96
PA1466 [#]	PA1466	glutathione S-transferase	0.96
PA0088	<i>tssF1</i>	hypothetical protein	0.95
PA1156	<i>nrdA</i>	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	0.95
PA1045	PA1045	ATP-dependent DNA helicase DinG	0.93
PA1046	PA1046	hypothetical protein	0.93
PA0523	<i>norC</i>	nitric-oxide reductase subunit C	0.90
PA1414	PA1414	hypothetical protein	0.90
PA3366.1	<i>amiL</i>	AmiL	0.89
PA4571	PA4571	cytochrome c	0.89
PA4570	PA4570	hypothetical protein	0.88
PA4328 [#]	PA4328	universal stress protein	0.86
PA0662	<i>argC</i>	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	0.86
PA3337	<i>rfaD</i>	ADP-L-glycero-D-mannoheptose 6-epimerase	0.85
PA3283	PA3283	hypothetical protein	0.84
PA0079	<i>tssK1</i>	hypothetical protein	0.84
PA0526	PA0526	hypothetical protein	0.84
PA1866 [#]	PA1866	DNA helicase	0.84
PA0527	<i>dnr</i>	transcriptional regulator Dnr	0.84
PA4582	PA4582	hypothetical protein	0.83
PA0459	PA0459	ClpA/B protease ATP binding subunit	0.83
PA1556	<i>ccoO2</i>	cbb3-type cytochrome c oxidase subunit II	0.83
PA2656	PA2656	two-component sensor	0.83
PA2591	PA2591	transcriptional regulator	0.82
PA4469	PA4469	hypothetical protein	0.81
PA0917	<i>kup</i>	potassium uptake protein Kup	0.81
PA0103	PA0103	sulfate transporter	0.80
PA0039	PA0039	hypothetical protein	-0.82
PA0153	<i>pcaH</i>	protocatechuate 3,4-dioxygenase, beta subunit	-0.82
PA2212	PA2212	4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase	-0.84
PA0227	PA0227	CoA transferase, subunit B	-0.84
PA4366	<i>sodB</i>	superoxide dismutase	-0.86
PA2619	<i>infA</i>	translation initiation factor IF-1	-0.87
PA1324	PA1324	hypothetical protein	-0.87
PA0355	<i>pfpI</i>	protease PfpI	-0.88
PA1711	<i>exsE</i>	ExsE	-0.88
PA2667 [#]	PA2667	mvaU	-0.89
PA0231	<i>pcaD</i>	beta-ketoadipate enol-lactone hydrolase	-0.91

Tabelle 24: Fortsetzung.

PA4880	PA4880	Bacterioferritin	-0.93
PA0228	<i>pcaF</i>	beta-ketoadipyl CoA thiolase	-0.93
PA1323	PA1323	hypothetical protein	-0.96
PA1710	<i>exsC</i>	ExsC, exoenzyme S synthesis protein C precursor	-0.96
PA0230	<i>pcaB</i>	3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase	-0.96
PA5481	PA5481	hypothetical protein	-1.04
PA2747	PA2747	hypothetical protein	-1.06
PA0154	<i>pcaG</i>	protocatechuate 3,4-dioxygenase, alpha subunit	-1.07
PA5482	PA5482	hypothetical protein	-1.11
PA0232	<i>pcaC</i>	gamma-carboxymuconolactone decarboxylase	-1.13
PA2166	PA2166	hypothetical protein	-1.15
PA4738	PA4738	hypothetical protein	-1.46
PA2064	<i>pcoB</i>	copper resistance protein B precursor	-1.53
PA4739	PA4739	hypothetical protein	-1.57
PA2065	<i>pcoA</i>	copper resistance protein A precursor	-1.81
PA2807 [#]	PA2807	Putative copper binding protein	-1.90

[#] Funktionszuordnung durch manuelle Annotierung

* Funktionszuordnung durch Literatur (Brazas & Hancock, 2005)

Tabelle 25: Das Transkriptionsprofil von *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit im Vergleich zum Standard. Aufgelistet sind Gene mit einer statistisch signifikanten Veränderung bezüglich der Transkriptmenge ($\log FC > \pm 0.8$).

Systematischer Name	Genname	Beschreibung	logFC
PA0636*	PA0636	bacteriophage protein	4.10
PA0633*	PA0633	bacteriophage protein	3.96
PA0634	PA0634	hypothetical protein	3.72
PA0625*	PA0625	bacteriophage protein	3.71
PA0624	PA0624	hypothetical protein	3.71
PA0619	PA0619	bacteriophage protein	3.70
PA0623	PA0623	bacteriophage protein	3.68
PA0626*	PA0626	bacteriophage protein	3.64
PA0646*	PA0646	bacteriophage protein	3.63
PA0617	PA0617	bacteriophage protein	3.54
PA0614	PA0614	bacteriophage protein	3.41
PA0635	PA0635	hypothetical protein	3.39
PA0622	PA0622	bacteriophage protein	3.37
PA0632	PA0632	hypothetical protein	3.36
PA0618	PA0618	bacteriophage protein	3.32
PA0639*	PA0639	bacteriophage protein	3.31
PA0615	PA0615	hypothetical protein	3.31

Tabelle 25: Fortsetzung.

PA1150	<i>pys2</i>	pyocin S2	3.29
PA0642	PA0642	hypothetical protein	3.29
PA3866	PA3866	pyocin protein	3.27
PA0616*	PA0616	bacteriophage protein	3.22
PA0647	PA0647	hypothetical protein	3.21
PA0620	PA0620	bacteriophage protein	3.14
PA0629*	PA0629	bacteriophage protein	3.13
PA0648	PA0648	hypothetical protein	3.12
PA0640	PA0640	bacteriophage protein	3.06
PA0643*	PA0643	bacteriophage protein	3.06
PA0613	PA0613	hypothetical protein	2.99
PA4704.2	<i>prfF2</i>	regulatory RNA PrrF2	2.97
PA0638	PA0638	bacteriophage protein	2.96
PA0644	PA0644	hypothetical protein	2.94
PA0729.1	PA0729.1	tRNA-Gly	2.92
PA0627*	PA0627	bacteriophage protein	2.91
PA0637*	PA0637	bacteriophage protein	2.89
PA0645	PA0645	hypothetical protein	2.88
PA3621.1	<i>rsmZ</i>	regulatory RNA RsmZ	2.84
PA0985	<i>pyoS5</i>	pyocin S5	2.84
PA0630	PA0630	hypothetical protein	2.83
PA0628*	PA0628	bacteriophage protein	2.83
PA0612	<i>ptrB</i>	repressor, PtrB	2.81
PA0621*	PA0621	bacteriophage protein	2.80
PA0641	PA0641	bacteriophage protein	2.77
PA0610	<i>prrN</i>	transcriptional regulator PrtN	2.60
PA0631	PA0631	hypothetical protein	2.50
PA4704.1	<i>prrF1</i>	regulatory RNA PrrF1	2.35
PA0527.1	<i>rsmY</i>	regulatory RNA RsmY	2.22
PA0807	<i>ampDh3</i>	AmpDh3	2.22
PA4937.1	PA4937.1	tRNA-Leu	2.17
PA0910	PA0910	hypothetical protein	2.13
PA3305.1	<i>phrS</i>	PhrS	1.95
PA0909	PA0909	hypothetical protein	1.93
PA0911	PA0911	hypothetical protein	1.92
PA2581.1	PA2581.1	tRNA-Cys	1.81
PA3617	<i>recA</i>	recombinase A	1.81
PA3366.1	<i>amiL</i>	AmiL	1.76
PA1151	<i>imm2</i>	pyocin S2 immunity protein	1.72
PA4763	<i>recN</i>	DNA repair protein RecN	1.69
PA0908	PA0908	hypothetical protein	1.67
PA0905.1	PA0905.1	tRNA-Ser	1.61
PA5227.1	<i>ssrS</i>	6S RNA	1.58
PA0907	PA0907	hypothetical protein	1.56

Tabelle 25: Fortsetzung

PA2819.3	PA2819.3	tRNA-Glu	1.54
PA0808	PA0808	hypothetical protein	1.47
PA3094.1	PA3094.1	tRNA-Asp	1.43
PA5160.1	PA5160.1	tRNA-Thr	1.42
PA1804.1	PA1804.1	tRNA-Asp	1.42
PA2288	PA2288	hypothetical protein	1.39
PA4673.1	PA4673.1	tRNA-Met	1.37
PA0922	PA0922	hypothetical protein	1.36
PA3007	<i>lexA</i>	LexA repressor	1.32
PA0649	<i>trpG</i>	anthranilate synthase component II	1.31
PA1013.1	PA1013.1	tRNA-Ser	1.26
PA0650	<i>trpD</i>	anthranilate phosphoribosyltransferase	1.25
PA0657	PA0657	ATPase	1.22
PA5429	<i>aspA</i>	aspartate ammonia-lyase	1.19
PA0714.1	<i>phrD</i>	PhrD	1.17
PA3031.1	PA3031.1	tRNA-Pro	1.16
PA0815	PA0815	transcriptional regulator	1.14
PA2775.1	PA2775.1	tRNA-Val	1.09
PA4067	<i>oprG</i>	Outer membrane protein OprG precursor	1.07
PA2852.1	PA2852.1	tRNA-Ser	1.07
PA0819	PA0819	hypothetical protein	1.04
PA3008 [#]	PA3008	SOS response cell division inhibitor	1.02
PA4746.2	PA4746.2	tRNA-Leu	0.99
PA0671	PA0671	hypothetical protein	0.98
PA1673	PA1673	hypothetical protein	0.98
PA1796.2	PA1796.2	tRNA-His	0.97
PA0906	PA0906	transcriptional regulator	0.97
PA0651	<i>trpC</i>	indole-3-glycerol-phosphate synthase	0.96
PA5170	<i>arcD</i>	arginine/ornithine antiporter	0.95
PA2603.1	PA2603.1	tRNA-Ser	0.95
PA3413	PA3413	hypothetical protein	0.94
PA4541.2	PA4541.2	tRNA-Pro	0.94
PA3368.1	PA3368.1	tRNA-Arg	0.94
PA0828	PA0828	transcriptional regulator	0.94
PA0611	<i>priR</i>	transcriptional regulator PriR	0.94
PA0817	PA0817	ring-cleaving dioxygenase	0.92
PA1796.3	PA1796.3	tRNA-Leu	0.92
PA0654	<i>speD</i>	S-adenosylmethionine decarboxylase	0.92
PA0669	PA0669	DNA polymerase alpha chain	0.90
PA0263.1	PA0263.1	tRNA-Arg	0.89
PA3309	PA3309	hypothetical protein	0.89
PA3616	PA3616	recombination regulator RecX	0.89
PA0519	<i>nirS</i>	nitrite reductase precursor	0.86
PA0574.1	PA0574.1	tRNA-Met	0.86

Tabelle 25: Fortsetzung.

PA0820	PA0820	hypothetical protein	0.85
PA1865	PA1865	hypothetical protein	0.85
PA1414	PA1414	hypothetical protein	0.85
PA5475 [#]	PA5475	acetyltransferase	0.82
PA0653 [#]	PA0653	redox protein	0.82
PA0161	PA0161	hypothetical protein	0.81
PA2570.1	PA2570.1	tRNA-Leu	0.81
PA4255	<i>rpmC</i>	50S ribosomal protein L29	-0.80
PA5557	<i>atpH</i>	F0F1 ATP synthase subunit delta	-0.81
PA1589	<i>sucD</i>	succinyl-CoA synthetase subunit alpha	-0.81
PA4273	<i>rplA</i>	50S ribosomal protein L1	-0.82
PA0993	<i>cupC2</i>	chaperone CupC2	-0.83
PA0579	<i>rpsU</i>	30S ribosomal protein S21	-0.83
PA4275	<i>nusG</i>	transcription antitermination protein NusG	-0.83
PA3656	<i>rpsB</i>	30S ribosomal protein S2	-0.85
PA3031 [#]	PA3031	lipoprotein	-0.85
PA1323	PA1323	hypothetical protein	-0.85
PA4934	<i>rpsR</i>	30S ribosomal protein S18	-0.86
PA4237	<i>rplQ</i>	50S ribosomal protein L17	-0.87
PA1592	PA1592	hypothetical protein	-0.89
PA3655	<i>tsf</i>	elongation factor Ts	-0.90
PA4525	<i>pilA</i>	type 4 fimbrial precursor PilA	-0.90
PA2970	<i>rpmF</i>	50S ribosomal protein L32	-0.90
PA4433	<i>rplM</i>	50S ribosomal protein L13	-0.90
PA2323	PA2323	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-0.90
PA4266	<i>fusA1</i>	elongation factor G	-0.91
PA0456	PA0456	cold-shock protein	-0.91
PA4262	<i>rplD</i>	50S ribosomal protein L4	-0.91
PA4239	<i>rpsD</i>	30S ribosomal protein S4	-0.93
PA4671	PA4671	50S ribosomal protein L25/general stress proteinCtc	-0.94
PA4254	<i>rpsQ</i>	30S ribosomal protein S17	-0.95
PA2743	<i>infC</i>	translation initiation factor IF-3	-0.95
PA4432	<i>rpsI</i>	30S ribosomal protein S9	-0.95
PA4248	<i>rplF</i>	50S ribosomal protein L6	-0.96
PA4563	<i>rpsT</i>	30S ribosomal protein S20	-0.97
PA4250	<i>rpsN</i>	30S ribosomal protein S14	-0.97
PA4247	<i>rplR</i>	50S ribosomal protein L18	-0.97
PA2741	<i>rplT</i>	50S ribosomal protein L20	-1.00
PA3456	PA3456	5-methylaminomethyl-2-thiouridinemethyltransferase	-1.00
PA4263	<i>rplC</i>	50S ribosomal protein L3	-1.01
PA4253	<i>rplN</i>	50S ribosomal protein L14	-1.01
PA4244	<i>rplO</i>	50S ribosomal protein L15	-1.01

Tabelle 25: Fortsetzung.

PA4267	<i>rpsG</i>	30S ribosomal protein S7	-1.01
PA4246	<i>rpsE</i>	30S ribosomal protein S5	-1.04
PA4270.1	P26	P26	-1.06
PA5316	<i>rpmB</i>	50S ribosomal protein L28	-1.06
PA3824.1	PA3824.1	tRNA-Leu	-1.06
PA2742	<i>rpmI</i>	50S ribosomal protein L35	-1.07
PA1588	<i>sucC</i>	succinyl-CoA synthetase subunit beta	-1.08
PA4243	<i>secY</i>	preprotein translocase subunit SecY	-1.10
PA4265	<i>tufA</i>	elongation factor Tu	-1.10
PA4238	<i>rpoA</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	-1.14
PA2619	<i>infA</i>	translation initiation factor IF-1	-1.15
PA4258	<i>rplV</i>	50S ribosomal protein L22	-1.16
PA4277	<i>tufB</i>	elongation factor Tu	-1.18
PA4241	<i>rpsM</i>	30S ribosomal protein S13	-1.19
PA4257	<i>rpsC</i>	30S ribosomal protein S3	-1.20
PA4271	<i>rplL</i>	50S ribosomal protein L7/L12	-1.21
PA4260	<i>rplB</i>	50S ribosomal protein L2	-1.22
PA4366	<i>sodB</i>	superoxide dismutase	-1.23
PA4256	<i>rplP</i>	50S ribosomal protein L16	-1.24
PA4261	<i>rplW</i>	50S ribosomal protein L23	-1.25
PA4245	<i>rpmD</i>	50S ribosomal protein L30	-1.26
PA5315	<i>rpmG</i>	50S ribosomal protein L33	-1.28
PA4264	<i>rpsJ</i>	30S ribosomal protein S10	-1.30
PA4249	<i>rpsH</i>	30S ribosomal protein S8	-1.30
PA4259	<i>rpsS</i>	30S ribosomal protein S19	-1.32
PA1777	<i>oprF</i>	Major porin and structural outer membrane porinOprF precursor	-1.33
PA1804	<i>hupB</i>	DNA-binding protein HU	-1.34
PA2853	<i>oprI</i>	Outer membrane lipoprotein OprI precursor	-1.34
PA2966	<i>acpP</i>	acyl carrier protein	-1.35
PA4242	<i>rpmJ</i>	50S ribosomal protein L36	-1.37
PA4252	<i>rplX</i>	50S ribosomal protein L24	-1.38
PA4251	<i>rplE</i>	50S ribosomal protein L5	-1.42
PA4268	<i>rpsL</i>	30S ribosomal protein S12	-1.49
PA4272	<i>rplJ</i>	50S ribosomal protein L10	-1.57
PA4738	PA4738	hypothetical protein	-2.03
PA0992	<i>cupC1</i>	fimbrial subunit CupC1	-2.14
PA4793	PA4793	hypothetical protein	-2.40

Funktionszuordnung durch manuelle Annotierung

* Funktionszuordnung durch Literatur (Brazas & Hancock, 2005)

Tabelle 26: Übereinstimmung zwischen dem Transkriptionsprofil von *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin und von Ciprofloxacin und Tellurit im Vergleich zum Standard. Aufgelistet sind Gene mit einer statistisch signifikanten Veränderung bezüglich der Transkriptmenge ($\log FC > \pm 0.8$). Cipro: Ciprofloxacin, Cipro+Te: Ciprofloxacin und Tellurit.

Systematischer Name	Genname	Beschreibung	logFC (Cipro)	logFC (Cipro+Te)
PA0642	PA0642	hypothetical protein	5.86	3.23
PA0635	PA0635	hypothetical protein	5.64	3.39
PA0632	PA0632	hypothetical protein	4.91	3.36
PA0647	PA0647	hypothetical protein	4.90	3.21
PA0615	PA0615	hypothetical protein	4.51	3.31
PA0644	PA0644	hypothetical protein	4.49	2.94
PA0645	PA0645	hypothetical protein	4.48	2.88
PA0630	PA0630	hypothetical protein	4.30	2.83
PA0648	PA0648	hypothetical protein	4.21	3.12
PA0634	PA0634	hypothetical protein	4.20	3.72
PA0624	PA0624	hypothetical protein	4.13	3.71
PA0613	PA0613	hypothetical protein	3.99	2.99
PA0631	PA0631	hypothetical protein	3.98	2.50
PA0909	PA0909	hypothetical protein	3.54	1.93
PA0911	PA0911	hypothetical protein	3.30	1.92
PA0910	PA0910	hypothetical protein	3.67	2.12
PA0819	PA0819	hypothetical protein	1.88	1.04
PA0907	PA0907	hypothetical protein	2.45	1.56
PA0922	PA0922	hypothetical protein	2.43	1.36
PA2288	PA2288	hypothetical protein	2.38	1.39
PA3413	PA3413	hypothetical protein	2.13	0.94
PA1673	PA1673	hypothetical protein	1.33	0.98
PA0820	PA0820	hypothetical protein	1.05	0.85
PA1414	PA1414	hypothetical protein	0.90	0.85
PA3309	PA3309	hypothetical protein	1.27	0.89
PA0671	PA0671	hypothetical protein	2.65	0.98
PA0808	PA0808	hypothetical protein	2.58	1.47
PA1865	PA1865	hypothetical protein	2.04	0.85
PA0908	PA0908	hypothetical protein	2.93	1.67
PA0636*	PA0636	bacteriophage protein	5.51	4.10
PA0625*	PA0625	bacteriophage protein	5.50	3.7
PA0646*	PA0646	bacteriophage protein	5.28	3.6
PA0643*	PA0643	bacteriophage protein	4.95	3.06
PA0621*	PA0621	bacteriophage protein	3.59	2.80
PA0628*	PA0628	bacteriophage protein	3.91	2.83
PA0616*	PA0616	bacteriophage protein	4.14	3.22
PA0627*	PA0627	bacteriophage protein	4.45	2.91
PA0626*	PA0626	bacteriophage protein	4.42	3.6

Tabelle 26: Fortsetzung.

PA0637*	PA0637	bacteriophage protein	4.37	2.89
PA0639*	PA0639	bacteriophage protein	4.34	3.31
PA0629*	PA0629	bacteriophage protein	4.80	3.13
PA0633*	PA0633	bacteriophage protein	4.95	3.96
PA0614*	PA0614	bacteriophage protein	5.24	3.41
PA0985	<i>pyoS5</i>	pyocin S5	5.69	2.84
PA1150	<i>pys2</i>	pyocin S2	5.10	3.29
PA0640	PA0640	bacteriophage protein	4.93	3.06
PA3866	PA3866	pyocin protein	4.90	3.27
PA0623	PA0623	bacteriophage protein	4.69	3.68
PA0622	PA0622	bacteriophage protein	4.69	3.37
PA0638	PA0638	bacteriophage protein	4.56	2.96
PA0619	PA0619	bacteriophage protein	4.40	3.69
PA0617	PA0617	bacteriophage protein	4.18	3.54
PA0618	PA0618	bacteriophage protein	4.09	3.32
PA0641	PA0641	bacteriophage protein	3.99	2.77
PA1151	<i>imm2</i>	pyocin S2 immunity protein	1.84	1.72
PA0620	PA0620	bacteriophage protein	3.54	3.14
PA3621.1	<i>rsmZ</i>	regulatory RNA RsmZ	1.11	2.84
PA3616	PA3616	recombination regulator RecX	1.92	0.89
PA4704.2	<i>prfF2</i>	regulatory RNA PrrF2	1.86	2.97
PA3305.1	<i>phrS</i>	PhrS	1.75	1.95
PA4704.1	<i>prfF1</i>	regulatory RNA PrrF1	1.66	2.35
PA0815	PA0815	transcriptional regulator	1.71	1.14
PA0906	PA0906	transcriptional regulator	1.39	0.97
PA0828	PA0828	transcriptional regulator	1.53	0.94
PA0611	<i>prtR</i>	transcriptional regulator PrtR	1.34	0.94
PA0612	<i>ptrB</i>	repressor, PtrB	3.96	2.81
PA0610	<i>prtN</i>	transcriptional regulator PrtN	3.17	2.60
PA3007	<i>lexA</i>	LexA repressor	2.56	1.32
PA5429	<i>aspA</i>	aspartate ammonia-lyase	2.54	1.19
PA0657	PA0657	ATPase	2.11	1.22
PA0519	<i>nirS</i>	nitrite reductase precursor	2.08	0.86
PA4763	<i>recN</i>	DNA repair protein RecN	2.83	1.69
PA0669	PA0669	DNA polymerase alpha chain	2.67	0.90
PA3617	<i>recA</i>	recombinase A	2.02	1.81
PA3008 [#]	PA3008	SOS response cell division inhibitor	2.34	1.02
PA5170	<i>arcD</i>	arginine/ornithine antiporter	1.99	0.95
PA4067	<i>oprG</i>	Outer membrane protein OprG precursor	1.74	1.07
PA0807	<i>ampDh3</i>	AmpDh3	2.88	2.22
PA0649	<i>trpG</i>	anthranilate synthase component II	1.66	1.31
PA0650	<i>trpD</i>	anthranilate phosphoribosyltransferase	1.54	1.25

Tabelle 26: Fortsetzung.

PA0654	<i>speD</i>	S-adenosylmethionine decarboxylase	1.42	0.92
PA0817	PA0817	ring-cleaving dioxygenase	1.32	0.92
PA0651	<i>trpC</i>	indole-3-glycerol-phosphate synthase	1.32	0.96
PA3366.1	<i>amiL</i>	AmiL	0.89	1.77
PA0653 [#]	PA0653	redox protein	1.29	0.82
PA5474 [#]	PA5475	acetyltransferase	1.24	0.82
PA1323	PA1323	hypothetical protein	-0.96	-0.85
PA4739	PA4739	hypothetical protein	-1.57	-2.40
PA4738	PA4738	hypothetical protein	-1.46	-2.03
PA4366	<i>sodB</i>	superoxide dismutase	-0.86	-1.23
PA2619	<i>infA</i>	translation initiation factor IF-1	-0.87	-1.15

[#] Funktionszuordnung durch manuelle Annotierung

* Funktionszuordnung durch Literatur (Brazas & Hancock, 2005)

Tabelle 27: Differenziell regulierte Gene von *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin. Aufgelistet sind Gene mit einer statistisch signifikanten Veränderung bezüglich der Transkriptmenge ($\log FC > \pm 0.8$).

Systematischer Name	Genname	Beschreibung	logFC
PA3414	PA3414	hypothetical protein	2.06
PA1046	PA1046	hypothetical protein	0.93
PA4582	PA4582	hypothetical protein	0.83
PA4469	PA4469	hypothetical protein	0.81
PA3283	PA3283	hypothetical protein	0.84
PA0079	<i>tssK1</i>	hypothetical protein	0.84
PA0526	PA0526	hypothetical protein	0.84
PA4570	PA4570	hypothetical protein	0.88
PA0088	<i>tssF1</i>	hypothetical protein	0.95
PA0093	PA0093	hypothetical protein	0.97
PA0082	<i>tssA1</i>	hypothetical protein	0.97
PA0083	<i>tssB1</i>	hypothetical protein	1.11
PA0084	<i>tssC1</i>	hypothetical protein	1.22
PA1746	PA1746	hypothetical protein	1.10
PA3572	PA3572	hypothetical protein	1.05
PA5446	PA5446	hypothetical protein	1.05
PA0087	<i>tssE1</i>	hypothetical protein	1.04
PA0086	<i>tagJ1</i>	hypothetical protein	1.11
PA0141	PA0141	hypothetical protein	1.19
PA0663	PA0663	hypothetical protein	1.17
PA0320	PA0320	hypothetical protein	1.48

Tabelle 27: Fortsetzung.

PA3613	PA3613	hypothetical protein	1.34
PA1362	PA1362	hypothetical protein	1.34
PA1152	PA1152	hypothetical protein	1.32
PA0836.1	P5	P5	1.30
PA2591	PA2591	transcriptional regulator	0.82
PA0527	<i>dnr</i>	transcriptional regulator Dnr	0.84
PA0839	PA0839	transcriptional regulator	1.11
PA2958.1	<i>rgsA</i>	RgsA	1.23
PA2426	<i>pvdS</i>	extracytoplasmic-function sigma-70 factor	1.76
PA0327 [#]	PA0327	transcriptional regulator	1.22
PA5171	<i>arcA</i>	arginine deiminase	2.02
PA5172	<i>arcB</i>	ornithine carbamoyltransferase	1.82
PA5173	<i>arcC</i>	carbamate kinase	1.80
PA0518	<i>nirM</i>	cytochrome c-551 precursor	1.73
PA5427	<i>adhA</i>	alcohol dehydrogenase	1.70
PA0524	<i>norB</i>	nitric-oxide reductase subunit B	1.14
PA0523	<i>norC</i>	nitric-oxide reductase subunit C	0.91
PA0662	<i>argC</i>	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	0.86
PA1866 [#]	PA1866	DNA helicase	0.84
PA3540	<i>algD</i>	GDP-mannose 6-dehydrogenase AlgD	2.68
PA4328 [#]	PA4328	universal stress protein	0.86
PA0069 [#]	PA0069	DNA repair photolyase	1.95
PA0670 [#]	PA0670	DNA repair nucleotidyltransferase	2.20
PA0917	<i>kup</i>	potassium uptake protein Kup	0.81
PA0103	PA0103	sulfate transporter	0.80
PA0090	<i>clpVI</i>	ClpVI	1.24
PA4710	<i>phuR</i>	heme/hemoglobin uptake outer membrane receptorPhuR precursor	0.99
PA0091	<i>vgrG1</i>	VgrG1	1.10
PA1156	<i>nrdA</i>	ribonucleotide-diphosphate reductase subunitalpha	0.95
PA1546	<i>hemN</i>	coproporphyrinogen III oxidase	1.31
PA2398	<i>fpvA</i>	ferripyoverdine receptor	1.53
PA0931	<i>pirA</i>	outer membrane receptor FepA	1.02
PA2656	PA2656	two-component sensor	0.83
PA0672	<i>hemO</i>	heme oxygenase	1.36
PA0829	PA0829	hydrolase	1.36
PA4587	<i>ccpR</i>	cytochrome c551 peroxidase precursor	1.22
PA2386	<i>pvdA</i>	L-ornithine N5-oxygenase	1.22
PA0085	<i>hcp1</i>	Hcp1	0.99

Tabelle 27: Fortsetzung.

PA4709	PA4709	hemin degrading factor	0.96
PA1045	PA1045	ATP-dependent DNA helicase DinG	0.93
PA3337	<i>rfaD</i>	ADP-L-glycero-D-mannoheptose 6-epimerase	0.85
PA0459	PA0459	ClpA/B protease ATP binding subunit	0.83
PA1556	<i>ccoO2</i>	cbb3-type cytochrome c oxidase subunit II	0.83
PA4571	PA4571	cytochrome c	0.89
PA0674	<i>vreA</i>	VreA	1.03
PA0545 [#]	PA0545	putative reductase	1.31
PA2412 [#]	PA2412	Mbth-like protein	1.37
PA4348 [#]	PA4348	flavoprotein	1.28
PA1466 [#]	PA1466	Glutathion S-transferase	0.96
PA2807	PA2807	hypothetical protein	-1.90
PA2166	PA2166	hypothetical protein	-1.15
PA5482	PA5482	hypothetical protein	-1.11
PA5481	PA5481	hypothetical protein	-1.04
PA2747	PA2747	hypothetical protein	-1.06
PA2667	PA2667	hypothetical protein	-0.89
PA1324	PA1324	hypothetical protein	-0.87
PA0039	PA0039	hypothetical protein	-0.82
PA1711	<i>exsE</i>	ExsE	-0.88
PA1710	<i>exsC</i>	ExsC, exoenzyme S synthesis protein C precursor	-0.96
PA0228	<i>pcaF</i>	beta-ketoadipyl CoA thiolase	-0.93
PA0230	<i>pcaB</i>	3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase	-0.96
PA0154	<i>pcaG</i>	protocatechuate 3,4-dioxygenase, alpha subunit	-1.07
PA0232	<i>pcaC</i>	gamma-carboxymuconolactone decarboxylase	-1.13
PA0231	<i>pcaD</i>	beta-ketoadipate enol-lactone hydrolase	-0.91
PA0153	<i>pcaH</i>	protocatechuate 3,4-dioxygenase, beta subunit	-0.82
PA2212	PA2212	4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase	-0.84
PA0355	<i>pfpI</i>	protease PfpI	-0.88
PA2064	<i>pcoB</i>	copper resistance protein B precursor	-1.53
PA2065	<i>pcoA</i>	copper resistance protein A precursor	-1.81
PA0227	PA0227	CoA transferase, subunit B	-0.84
PA4880	PA4880	bacterioferritin	-0.93

[#] Funktionszuordnung durch manuelle Annotierung

Tabelle 28: Differentiell regulierte Gene von *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit. Aufgelistet sind Gene mit einer statistisch signifikanten Veränderung bezüglich der Transkriptmenge ($\log FC > \pm 0.8$).

Systematischer Name	Genname	Beschreibung	logFC
PA0161	PA0161	hypothetical protein	0.81
PA0527.1	<i>rsmY</i>	regulatory RNA RsmY	2.22
PA0714.1	<i>phrD</i>	PhrD	1.17
PA0729.1	PA0729.1	tRNA-Gly	2.92
PA4937.1	PA4937.1	tRNA-Leu	2.17
PA2581.1	PA2581.1	tRNA-Cys	1.81
PA0905.1	PA0905.1	tRNA-Ser	1.61
PA5227.1	<i>ssrS</i>	6S RNA	1.58
PA2819.3	PA2819.3	tRNA-Glu	1.54
PA3094.1	PA3094.1	tRNA-Asp	1.43
PA5160.1	PA5160.1	tRNA-Thr	1.42
PA1804.1	PA1804.1	tRNA-Asp	1.42
PA4673.1	PA4673.1	tRNA-Met	1.37
PA1013.1	PA1013.1	tRNA-Ser	1.26
PA3031.1	PA3031.1	tRNA-Pro	-0.85
PA2852.1	PA2852.1	tRNA-Ser	1.07
PA4746.2	PA4746.2	tRNA-Leu	0.99
PA1796.2	PA1796.2	tRNA-His	0.97
PA2603.1	PA2603.1	tRNA-Ser	0.95
PA4541.2	PA4541.2	tRNA-Pro	0.94
PA3368.1	PA3368.1	tRNA-Arg	0.94
PA0263.1	PA0263.1	tRNA-Arg	0.89
PA0574.1	PA0574.1	tRNA-Met	0.86
PA2570.1	PA2570.1	tRNA-Leu	0.81
PA2775.1	PA2775.1	tRNA-Val	1.09
PA1796.3	PA1796.3	tRNA-Leu	0.92
PA1592	PA1592	hypothetical protein	-0.89
PA4275	<i>nusG</i>	transcription antitermination protein NusG	-0.83
PA5557	<i>atpH</i>	F0F1 ATP synthase subunit delta	-0.81
PA1589	<i>sucD</i>	succinyl-CoA synthetase subunit alpha	-0.81
PA2966	<i>acpP</i>	acyl carrier protein	-1.35
PA1804	<i>hupB</i>	DNA-binding protein HU	1.42
PA1588	<i>sucC</i>	succinyl-CoA synthetase subunit beta	-1.08
PA2323	PA2323	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-0.90
PA0993	<i>cupC2</i>	chaperone CupC2	-0.83
PA4525	<i>pilA</i>	type 4 fimbrial precursor PilA	-0.90

Tabelle 28: Fortsetzung.

PA0992	<i>cupC1</i>	fimbrial subunit CupC1	-2.14
PA0456	PA0456	cold-shock protein	-0.91
PA4243	<i>secY</i>	preprotein translocase subunit SecY	-1.10
PA1777	<i>oprF</i>	Major porin and structural outer membrane porinOprF precursor	-1.33
PA2853	<i>oprI</i>	Outer membrane lipoprotein OprI precursor	-1.34
PA0579	<i>rpsU</i>	30S ribosomal protein S21	-0.83
PA4266	<i>fusA1</i>	elongation factor G	-0.91
PA2970	<i>rpmF</i>	50S ribosomal protein L32	-0.90
PA4433	<i>rplM</i>	50S ribosomal protein L13	-0.90
PA3655	<i>tsf</i>	elongation factor Ts	-0.90
PA4934	<i>rpsR</i>	30S ribosomal protein S18	-0.86
PA4237	<i>rplQ</i>	50S ribosomal protein L17	-0.87
PA3656	<i>rpsB</i>	30S ribosomal protein S2	-0.85
PA4273	<i>rplA</i>	50S ribosomal protein L1	-0.82
PA4255	<i>rpmC</i>	50S ribosomal protein L29	-0.80
PA4242	<i>rpmJ</i>	50S ribosomal protein L36	-1.37
PA4252	<i>rplX</i>	50S ribosomal protein L24	-1.38
PA4251	<i>rplE</i>	50S ribosomal protein L5	-1.42
PA4268	<i>rpsL</i>	30S ribosomal protein S12	-1.49
PA4272	<i>rplJ</i>	50S ribosomal protein L10	-1.57
PA4265	<i>tufA</i>	elongation factor Tu	-1.10
PA4258	<i>rplV</i>	50S ribosomal protein L22	-1.16
PA4277	<i>tufB</i>	elongation factor Tu	-1.18
PA4241	<i>rpsM</i>	30S ribosomal protein S13	-1.19
PA4257	<i>rpsC</i>	30S ribosomal protein S3	-1.20
PA4271	<i>rplL</i>	50S ribosomal protein L7/L12	-1.21
PA4260	<i>rplB</i>	50S ribosomal protein L2	-1.22
PA4256	<i>rplP</i>	50S ribosomal protein L16	-1.24
PA4261	<i>rplW</i>	50S ribosomal protein L23	-1.25
PA4245	<i>rpmD</i>	50S ribosomal protein L30	-1.26
PA5315	<i>rpmG</i>	50S ribosomal protein L33	-1.28
PA4264	<i>rpsJ</i>	30S ribosomal protein S10	-1.30
PA4249	<i>rpsH</i>	30S ribosomal protein S8	-1.30
PA4259	<i>rpsS</i>	30S ribosomal protein S19	-1.32
PA5316	<i>rpmB</i>	50S ribosomal protein L28	-1.06
PA3824.1	PA3824.1	tRNA-Leu	-1.06
PA2742	<i>rpmI</i>	50S ribosomal protein L35	-1.07
PA4263	<i>rplC</i>	50S ribosomal protein L3	-1.00
PA4253	<i>rplN</i>	50S ribosomal protein L14	-1.01
PA4244	<i>rplO</i>	50S ribosomal protein L15	-1.01

Tabelle 28: Fortsetzung.

PA4267	<i>rpsG</i>	30S ribosomal protein S7	-1.01
PA4246	<i>rpsE</i>	30S ribosomal protein S5	-1.04
PA4262	<i>rplD</i>	50S ribosomal protein L4	-0.91
PA4239	<i>rpsD</i>	30S ribosomal protein S4	-0.93
PA4671	PA4671	50S ribosomal protein L25 (general stress proteinCtc)	-0.94
PA4254	<i>rpsQ</i>	30S ribosomal protein S17	-0.95
PA2743	<i>infC</i>	translation initiation factor IF-3	-0.94
PA4432	<i>rpsI</i>	30S ribosomal protein S9	-0.95
PA4248	<i>rplF</i>	50S ribosomal protein L6	-0.96
PA4563	<i>rpsT</i>	30S ribosomal protein S20	-0.97
PA4250	<i>rpsN</i>	30S ribosomal protein S14	-0.97
PA4247	<i>rplR</i>	50S ribosomal protein L18	-0.97
PA2741	<i>rplT</i>	50S ribosomal protein L20	-1.00
PA3456	PA3456	5-methylaminomethyl-2-thiouridinemethyltransferase	-1.00
PA4270.1	P26	P26	-1.06
PA3031 [#]	PA3031	lipoprotein	-0.85
PA4238	<i>rpoA</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	-1.14

[#] Funktionszuordnung durch manuelle Annotierung

Metabolisch stationäre Zustände von *P. aeruginosa* PAO1

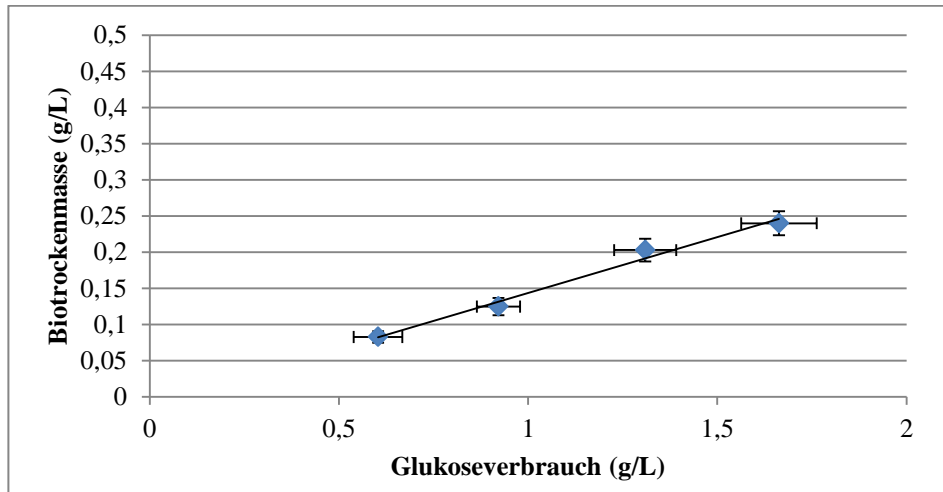


Abbildung 16: Metabolisches Profil der verbrauchten Glukosekonzentration und der gebildeten Trockenmasse von *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin. Der metabolisch stationäre Zustand wird durch eine konstante Biomasseausbeute visualisiert, der durch die Steigung der gebildeten Trockenmasse zur verbrauchten Glukose abgeleitet wird. Die blauen Punkte markieren die Probeentnahme.

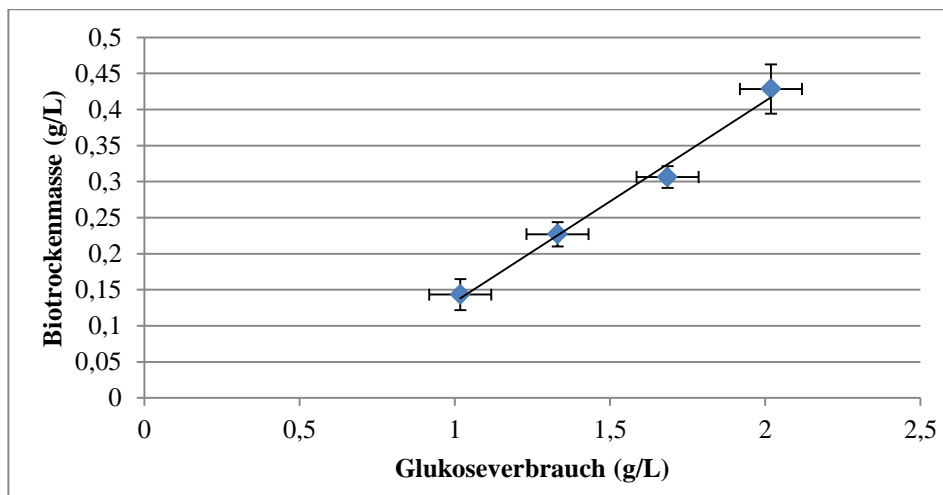


Abbildung 17: Metabolisches Profil der verbrauchten Glukosekonzentration und der gebildeten Trockenmasse von *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Tellurit. Der metabolisch stationäre Zustand wird durch eine konstante Biomasseausbeute visualisiert, der durch die Steigung der gebildeten Trockenmasse zur verbrauchten Glukose abgeleitet wird. Die blauen Punkte markieren die Probeentnahme.

Tabelle 29: Isotopisch stationäre Zustände von *P. aeruginosa* PAO1 in Anwesenheit von Ciprofloxacin bzw. Ciprofloxacin und Tellurit. Geringe Standardabweichungen (STABW) der Markierungsdaten einer Kultivierung in [1-¹³C]-Glukoseminimalmedium kennzeichnen den isotopisch stationären Zustand.

m: Anteil der unmarkierten Massenisotopomerfragmente, m₁: Anteil der einfach markierten Massenisotopomerfragmente, m₂: Anteil der zweifach markierten Massenisotopomerfragmente.

Verbindung	Alanin	Glycin	Valin	Serin		Threonin	Phenyl- alanin	Aspartat	Glutamat	Tyrosin
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 Ciprofloxacin										
m	0.4059	0.7477	0.3911	0.6363	0.7360	0.4293	0.6480	0.4272	0.5449	0.5583
m+1	0.4429	0.1806	0.4414	0.2323	0.1914	0.3269	0.2400	0.3272	0.2846	0.2716
m+2	0.1136	0.0718	0.1205	0.1061	0.0726	0.1695	0.0866	0.1703	0.1232	0.1209
STABW m	0.0084	0.0005	0.0124	0.0003	0.0007	0.0104	0.0024	0.0083	0.0040	0.0032
STABW m+1	0.0068	0.0006	0.0096	0.0002	0.0005	0.0045	0.0009	0.0037	0.0031	0.0016
STABW m+2	0.0010	0.0001	0.0018	0.0001	0.0002	0.0035	0.0005	0.0025	0.0002	0.0015
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 Ciprofloxacin + Tellurit										
m	0.4031	0.7466	0.3820	0.6344	0.7348	0.4187	0.6463	0.4173	0.5391	0.5573
m+1	0.4454	0.1816	0.4462	0.2331	0.1921	0.3313	0.2410	0.3310	0.2885	0.2728
m+2	0.1138	0.0718	0.1221	0.1066	0.0731	0.1732	0.0870	0.1739	0.1242	0.1209
STABW m	0.0045	0.0002	0.0037	0.0010	0.0027	0.0023	0.0012	0.0024	0.0017	0.0021
STABW m+1	0.0037	0.0001	0.0005	0.0005	0.0012	0.0010	0.0008	0.0006	0.0012	0.0020
STABW m+2	0.0005	0.0001	0.0005	0.0004	0.0015	0.0011	0.0009	0.0009	0.0003	0.0009

Danksagung

Prof. Dr. Dieter Jahn danke ich für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit in seinem Arbeitskreis anfertigen zu können und für die Übernahme des Gutachtens.

Bei PD Dr. Max Schobert möchte ich mich für die Co-Betreuung, die nützlichen Ratschläge und Tipps sowie für die Übernahme des Gutachtens bedanken.

Prof. Dr. André Fleißner danke ich für die Übernahme des Vorsitzes meiner Prüfungskommission.

Bei Dr. Petra Tielen bedanke ich mich recht herzlich für die hervorragende Betreuung, die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie den Optimismus.

Dr. Rebekka Biedendieck danke ich für die Hilfe und Unterstützung rund um das Thema Transkriptomanalyse.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Katrin Dohnt, Dr. Antje Berger und Sandra Kerstan für die ausgezeichnete Zusammenarbeit im Rahmen des UroGenOmics-Projekts, die Bereitschaft jederzeit meine Frage zu beantworten sowie die Hilfe in den unterschiedlichsten Formen bedanken.

Bei meinen Arbeitskollegen Christin Uhlig, José Borrero de Acuna, Sebastian Laaß, Jenny Jacobs und Mathias Ebert danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre.

Ich bedanke mich auch bei allen anderen Mitgliedern der AK Jahn sowie AG Steinert für die nette Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ein besonderer Dank gilt den weltallerbesten Studentinnen Wiebke Michel und Julia Kreibich, die ihre Bachelorarbeit im Rahmen dieser Doktorarbeit angefertigt haben und deren Ergebnisse zu dieser Arbeit mit beigetragen haben.

Ein riesengroßes Dankeschön gilt Julia Hoppe, Elena Fuchs, Kristin Haufschild, Andrea Wesche-Franke sowie Christin Uhlig für die sensationelle Zeit innerhalb und außerhalb des Labors.

Zuletzt geht ein ganz besonderer Dank an meine Familie, die mich während des Studiums und der Promotion unterstützt hat und immer für mich da war.